

**Zpráva o řešení výzkumného záměru
Masarykova onkologického ústavu v Brně
s názvem
**Funkční diagnostika zhoubných nádorů
v roce 2007****

Struktura výzkumného záměru Masarykova onkologického ústavu s názvem Funkční diagnostika zhoubných nádorů ve zkratce FUNDIN zůstala zachována také během celého roku 2007 včetně stanovených řešitelů nebo koordinátorů odpovědných za každý dílčí program i projekt. Účetnictví jednotlivých projektů je nadále vedeno v samostatných nákladových střediscích, což umožňuje vysokou transparentci při posuzování nákladů a efektivity práce jednotlivých výzkumných skupin.

Základní kostru komplexního výzkumného záměru FUNDIN o desítkách dílčích projektů tvoří nadále tři zastřešující programy :

- a) *program technologické podpory (PTP)* pro vývoj a validaci nových diagnostických metodik a technologií,
- b) *program informační podpory (PIP)* zaměřený na archivaci a analýzu dat a digitalizaci obrazu
- c) *program aplikovaných studií (PAS)* sledující aplikace inovací a jejich výsledky u jednotlivých diagnostických skupin v klinické praxi

Ve programech technologické i informační podpory bylo při řešení výzkumného záměru MOÚ FUNDIN v roce 2007 dosaženo nových prakticky aplikovatelných řešení v oblastech genomické, proteomické i buněčné diagnostiky a bioinformatiky. Část z nich je také předmětem řady publikací v našich i zahraničních časopisech. V programu aplikovaných studií probíhá další nábor a kultivace klinických souborů, průběžně vyhodnocovaných.

Významnou událostí, která vytváří nové možnosti výzkumnému záměru bylo v roce 2007 dokončení, otevření a schvalování provozu nového PET Centra s vlastním cyklotronem. Jde o významnou kapacitu , jejíž výzkumná část s odulovým spořádáním se připravuje pro vývoj nových radiofarmak k funkční a molekulární diagnostice nádorů. V první fázi se soustředíme na radiofarmaka se schopností stanovit radiosenzitivitu nádorových ložisek na bázi misonidazolu a kvalitativně nový způsob

radionavigované molekulární diagnostiky proteinového receptoru HER2, obojí tím na bázi radionuklidu ¹⁸F. Jde o velmi náročný a i mezinárodně kompetitivní úkol, pro jehož přípravu jsme již uskutečnili zahraniční stáže našich odborníků, jednání s experty ÚJV i investiční přípravu specifických modulů navázaných na cyklotron.

Dalším významným krokem pro kvalitativně nové projekty je technologická příprava na moderní metody konformní radioaterapie, vycházející ze strukturální a funkční diagnostiky náorových ložisek a jejich nehomogenit. Návrhy dvou nových projektů na toto téma jsou uvedeny v závěru zprávy a jejich příprava již byla zčásti zvládnuta i investičně.

Je nutno poznamenat, že práci na výzkumném záměru i v roce 2007, podobně jako v letech předchozích, komplikuje nedodržování zákonného ustanovení o přidělování smluvních prostředků ve stanoveném termínu a financování bylo MZd zajištěno zčásti až v druhé polovině srpna, s doplňkem pak až začátkem prosince. To klade mimořádné nároky na zálohování výzkumu ústavem provizorně z jiných prostředků, protože je nutno udržet kontinuitu práce i stabilitu kvalifikovaných výzkumných týmů. V roce 2007 byly podmínky pro systematickou výzkumnou práci komplikovány také vypuštěním grantové soutěže IGA MZd, což dále destabilizuje výzkumné pracovníky závislé na grantových prostředcích. Masarykův onkologický ústav díky své zdravé ekonomice a trvale kladnému hospodářskému výsledku tuto náročnou situaci opět zvládl i bez kolizí ve výzkumné práci, je však nucen vyjádřit svou nespokojenost a obavy z opakování každoročních nejistot smluvního financování výzkumného záměru.

Jako po všechna předcházející léta **předkládáme roční zprávu také veřejné kontrole na webových stránkách MOÚ www.mou.cz** v sekci věda a výzkum kde je tak patrný nejen pokrok v řešení výzkumného záměru dosažený v uplynulém roce, ale i celá kontinuita výzkumu MOÚ podporovaných institucionálním grantem Ministerstva zdravotnictví ČR jako výzkumný záměr FUNDIN No. 0002080501.

Prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.
ředitel MOÚ

Prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc
náměstek ředitele pro rozvoj, vědu a výuku

V Brně 2.1.2008

I. Program technologické podpory

Nové metody a nové geny v molekulárně genetické diagnostice nádorových chorob

Řešitel : MUDr.L.Foretová,PhD

1) Zavedení nových metod v laboratoři, srovnání sensitivity pre-sekvenačních metod

Využití 4-kapilárního sekvenátoru ABI3130 pro sekvenační a fragmentační analýzu.

Přístroj byl v naší laboratoři instalován v prosinci 2006. Počátkem roku 2007 byly optimalizovány podmínky pro provedení sekvenační a fragmentační analýzy a nyní je přístroj plně využíván pro diagnostickou práci. Užitím sekvenátoru ABI3130 došlo k podstatnému urychlení a automatizaci práce. Přístroj je využíván pro sekvenaci také dalšími pracovišti základny experimentální onkologie.

HRM – High Resolution Melting (Vysokorozlišovací analýza křivek tání)

Metoda je založena na principu heteroduplexní analýzy. U nás používáme k automatickému vyhodnocování přístroj LightScanner firmy Idaho Technologies. Vlastní metoda využívá vlastností fluorescenční barvy (používáme LCGreen plus), která se během PCR reakce inkorporuje do dsDNA. Během postupného zahřívání dochází k meltingu DNA a barva se z jednořetězců uvolňuje, což se projevuje poklesem fluorescence. Přítomnost heteroduplexu v analyzovaném fragmentu DNA výrazně mění profil křivky meltingu.

Metoda vyžaduje maximální optimalizaci PCR (pouze „čistá“ intenzivní PCR bez nespecifických fragmentů) přesnost v pipetování a standardní výchozí podmínky pro všechny vzorky – tj. u všech vzorků analyzovaných v jedné sérii použít přibližně stejné množství DNA (nejlépe mít vzorky naředěné na stejnou pracovní koncentraci a připravené stejnou izolační metodou) a analyzovat spolu pouze vzorky připravené z jednoho Master mixu. Jakákoli minimální odchylka v PCR mixu mezi jednotlivými vzorky se projeví změnou v profilu meltingu.

Z našich zkušeností jsme zachytili veškeré změny v DNA (substituce, drobné delece, inserce), které byly již dříve zachyceny jinými metodami. Záchyt substitucí je u HRM

bezesporu vyšší než u klasické heteroduplexní analýzy využívající elektroforetickou detekci v akrylamidovém (MDE) gelu. Metoda HRM umožňuje ve většině případů přesné rozlišení různých polymorfismů a mutací lokalizovaných ve stejném fragmentu a mnohdy zachytí také homozygotní varianty polymorfních oblastí. Rozlišení obou forem homozygotů v polymorfních oblastech je však možný pouze u některých oblastí – v závislosti na sekvenci analyzovaného úseku. Záchyt heterozygotního stavu je u metody HRM téměř 100%.

Metodu HRM používáme jako pre-sekvenační, tj. pozitivní nálezy mutací jsou vždy ověřeny sekvenováním, i když se profil mutace v HRM jeví jako naprosto jednoznačný.

Převedení klasické heteroduplexní analýzy na HRM analýzu a následně využití 4-kapilárního sekvenátoru ABI3130 vedlo ke zvýšení senzitivity, vyšší automatizaci a urychlení průchodu vzorků laboratoří. Celková doba potřebná ke kompletnímu vyšetření kódující sekvence genů BRCA1 a BRCA2 byla zkrácená na polovinu.

Pomocí HRM byla zachycena nová mutace v genu BRCA1, v oblasti sestřihu, která nebyla zjišťována pomocí HA a byla zpětně vyšetřena u 600 probandek původně negativně testovaných na BRCA1/2 mutace. Byla zachycena u 8, tj. u 1,3% pacientek.

Zkušenosti s HRM analýzou byly prezentovány na českých odborných seminářích a konferencích (HRM Workshop – IPVZ Praha 10.5.2007 ; ČAS 2007 Brno)

2) Rozšíření spektra vyšetření v laboratoři OEGN

Gen CHEK2

Produkt genu CHEK2 (alternativně CHK2, homolog Cds1 a RAD53) je významnou protein kinázou, která se podílí na regulaci buněčného cyklu. Při poškození DNA je CHEK2 protein kináza významná pro aktivaci celé řady proteinů (mimo jiné také p53, BRCA1), které se podílejí na řízení DNA reparace a apoptózy. V současné době jsou některé mutace v CHEK2 genu popisovány jako nízko penetrantní alely zvyšující 2-4-násobně riziko vzniku nádoru prsu. Některé studie popisují zvýšenou predispozici ke vzniku nádoru prostaty, plic, ovaria, mozkových nádorů a osteosarkomů.

V současné době je prováděn screening na přítomnost 2 mutací v CHEK2 genu u vysoce rizikových pacientů s nádorem prsu, u kterých nebyla detekována mutace v BRCA1 nebo BRCA2.

- 1) delece exonu 9 a 10 v CHEK2 genu – specifická pro Českou populaci: byly zachyceny 4 rodiny s delecí exonu 9 a 10 v CHEK2 genu. Celkem bylo vyšetřeno 392 rizikových jedinců PCR testem a 340 jedinců metodou MLPA.
- 2) mutace 1100delC CHEK2 genu je nejčastější mutací popsanou v Evropské populaci – na našem pracovišti byl zaveden screening v loňském roce, kdy do konce listopadu 2007 bylo vyšetřeno 498 rizikových pacientů a mutace 1100delC byla zachycena u 4 rodin. 1100delC mutace byla potvrzena sekvenováním.

Mutace v CHEK2 genu (1100delC nebo delece exonu 9,10) se pravděpodobně nachází v rizikové české populaci s frekvencí kolem 1% a bude nadále prováděno jejich vyšetření PCR testem.

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom): testování genů MLH1; MSH2 a MSH6 pomocí HRM

Jde o nejčastější dědičnou formu kolorektálního karcinomu. HNPCC syndrom je autozomálně dominantní a příčinou jsou mutace v některém z „mismatch“ reparačních (MMR) genů, které se účastní opravy drobných delecí, inzercí a nukleotidových záměn v DNA sekvenci

Z celkového počtu detekovaných mutací u HNPCC syndromu byly u téměř 90% rodin detekovány zárodečné mutace v MLH1 a MSH2 genu. Dalších téměř 9% zárodečných mutací bylo detekováno u MSH6 genu. Účast jiných genů na vznik HNPCC je pravděpodobně minoritní.

V roce 2007 byla optimalizovány podmínky PCR amplifikace pro metodu HRM (High Resolution Melting) – vysokorozlišovací analýza křivek tání s využitím přístroje Light Scanner firmu Idaho Technologies.

Prediktivní vyšetření na přítomnost známé mutace v MLH1, MSH2 nebo MSH6 bylo v roce 2007 provedeno u 18 jedinců.

Kompletní vyšetření kódující sekvence genů MLH1; MSH2 a MSH6 u rizikových pacientů se od konce roku 2007 provádí na našem pracovišti. Bylo zahájeno vyšetření 20 nově indikovaných rizikových rodin.

Gen p53

V roce 2007 byly objednány primery a optimalizovány PCR podmínky pro vyšetření genu p53. Vyšetřování u pacientů s podezřením na Li-Fraumeni syndrom bude prováděno metodou přímého sekvenování jednotlivých exonů (2-11) a míst sestřihu z genomické DNA. Na našem pracovišti bude prováděno jak prediktivní tak i kompletní vyšetření genu p53 u nově indikovaných případů.

Hereditární melanom – gen CDKN2A

Gen CDKN2A (lokalizace 9p21) je nádorový supresor, účastní se negativní regulace proliferace. Produktem genu je 9 různých proteinů, převážně tkáňově specifických. Z hlediska nádorové predispozice jsou nejvýznamnější 2 produkty CDKN2A exprimované ve všech tkáních:

- 1) protein p16/INK4a - inhibitor cyklin dependentní kinázy CDK4 a CDK6
- 2) protein p14/ARF – který interakcí s MDM1 brání degradaci p53 proteinu

Jedná se o poměrně vzácný hereditární nádorový syndrom. Během roku 2007 bylo indikováno k vyšetření *6 rizikových rodin*. Vyšetření probíhá přímým sekvenováním jednotlivých exonů CDKN2A genu.

Gilbertův syndrom

Molekulárně genetická diagnostika u Gilbertova syndromu (benigní forma nekonjugované bilirubinémie) byla v naší laboratoři zavedena na základě požadavku Oddělení klinických hodnocení v souvislosti s onkologickými klinickými studii a potřebou hodnocení hepatotoxicity v průběhu experimentální léčby.

Provádíme vyšetření inserce TA sekvence v TATA boxu v promotorové oblasti UGT1A1 genu (UDP-glukuronosyltransferáza 1), která je nejčastější příčinou Gilbertova syndromu v Evropské populaci (90%). Normální „wild type“ alela je repetice 6TA, mutovaná alela s insercí je tvořena repeticí 7TA. Klinické příznaky Gilbertova syndromu se projeví u homozygotů 7TA/7TA, kdy dochází snížení exprese UGT1A1 genu na 20-30%. Snížená exprese UGT1A1 genu může způsobit komplikace u metabolizace některých léčiv podávaných onkologickým pacientům.

Vyšetření provádíme souběžně 2 metodami: heteroduplexní analýzou a metodou HRM, což nám umožní přesnou genotypizaci vyšetřovaných jedinců (rozlišení homozygotů 6TA/6TA; 7TA/7TA a heterozygotů 6TA/7TA)

Farmakogenetika cytostatik

Řešitel : MUDr. D.Valík, PhD

Farmakogenetické a metabolické biomarkery terapie antifoláty

Řešitelé: MUDr. D. Valík, PhD, prof. MUDr. J. Štěrbá, CSc., MUDr. R. Demlová,

V průběhu roku 2006 pokračovala akvizice vzorků pacientů Kliniky dětské onkologie léčených protokolem obsahujícím 2 g/m² i.v. methotrexát až do jeho ukončení v klinické praxi v listopadu 2007. V současné době se připravuje koncept laboratorního sledování pacientů s ALL plánovaných k terapii Capizziho methotrexatem, tj. low-dose bez následného rescue leukovorinem.

Farmakogenetické aspekty terapie fluoropyrimidiny

Řešitelé: MUDr. D. Valík, PhD, MUDr. R. Demlová, MUDr. M. Bednaříková-Gálová

V průběhu roku pokračovaly práce na tomto projektu ve všech jeho třech ramenech:

i) v rameni „stanovení eliminačního fenotypu fluoropyrimidinů“ probíhala další akvizice pacientů léčených 5-FU dle protokolů „de Gramont“ a „FUFA Mayo“. V současnosti je zpracováno jak klinicky tak farmakokineticky 65 pacientů z celkově 83 zařazených do tohoto projektu. Akvizice bude dále pokračovat v roce 2007.

ii) v rameni „stanovení preterapeutické exkrece přirozených pyrimidinů“ jsme pokračovali v akvizici materiálu od pacientů zařazených do ramene (i); v tomto rameni budeme v r 2007 dále pracovat na metodě stanovení thyminu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií metodou stabilní izotopové diluce.

iii) v rámci „genotypizace genu pro DPYD“ jsme provedli ve spolupráci s laboratořemi Mendelova onkologického centra v Novém Jičíně pilotní sekvenaci vzorků u 20 pacientů; tento materiál byl vyhodnocen v průběhu roku 2007. Dosavadní data byla statisticky zpracována multivariační analýzou

Farmakogenetické aspekty terapie inhibitory topoisomerázy

Řešitelé: MUDr. D. Valík, PhD, MUDr. R. Demlová, Mgr. E. Macháčková, MUDr. M. Bednaříková-Gálová. Doc. Dr. L. Dušek, PhD

V roce 2007 byl zahájen nový projekt zaměřený na identifikaci jedinců v riziku toxické reakce po podání irinotecanu. Tato reakce bývá podmíněna zpomalenou eliminací aktivního metabolitu irinotecanu nazývaného SN-38. Tato látka je eliminována z organismu po konjugaci s glukuronovou kyselinou. U lidí s porušenou glukuronidací dochází ke zvyšování plasmatické koncentrace SN-38 s doprovodnými projevy toxicity – typicky jde o jedince, u nichž se vyskytuje jinak benigní hyperbilirubinemie, Gilbertův syndrom.

Ve spolupráci s OGEN MOÚ byla zavedena metodika stanovení mutace v TATA boxu genu kódujícím enzym glukuronyltransferázu, isoformu UGT1A1; elongace TATA boxu v promotorové sekvenci tohoto genu se považuje za příčinu Gilbertova syndromu. Farmakogenetickým projevem této jinak benigní metabolické úchytky je stav po podání irinotecanu a následné eliminace metabolitu SN-38. Jedinci s Gilbertovým syndromem jsou v riziku zvýšené toxicity způsobeném irinotecanem.

V průběhu roku 2007 jsem provedli validaci metody a akvizici a analýzu pilotní skupiny pacientů. Materiál, tj. genomová DNA, bude odebrán u všech pacientů k chemoterapii irinotecanem. Analýza bude provedena v první fázi retrospektivně u nemocných s výraznou toxicitou.

Publikace:

Valik D., Demlova R., Bednarikova M. Outlining pharmacogenetic approaches in anticancer treatment. *Tumor Biology* 28, 2007, suppl 1, p. 36

Testování chemoresistence MTT testy citlivosti nádorových buněk k cytostatikům

Řešitelé : Mgr. E. Michalová, I.Němečková

Laboratoř chemoresistence

Volba chemoterapeutik, jejich kombinace a dávkovací schémata v případě jednotlivých diagnóz jsou založena na empirických zkušenostech a statistických výsledcích multicentrických studií. V systémové chemoterapii nádorových onemocnění se standardně využívají v klinických studiích ověřené režimy a statisticky nejúspěšnější terapie je vnímána jako nejlepší léčebný postup. Teprve při selhání léčby první, druhé, nebo vyšší řady je výběr chemoterapie omezen a volba léčby není standardně určena. Nicméně ani statisticky nejefektivnější způsob terapie není zárukou úspěšné léčby a vždy existuje podíl případů dané diagnózy, u nichž není dosaženo očekávaného výsledku chemoterapie. Účinek chemoterapeutik není přísně specifický a cytostatika nepůsobí selektivně na nádorové buňky, nýbrž svými toxickými účinky postihuje více či méně i buňky normální.

Respektování faktorů individuality a zavádění „personalizované medicíny“ je směrem, jehož cílem je co nejvíce zvýšit účinnost terapie s minimálním vedlejším zatížením pacienta. Jedním z přístupů individualizované chemoterapie je snaha o výběr cytostatik s maximální účinností pro daný nádor za současné eliminace těch, k nimž je nádor vysoce rezistentní, a to na základě hodnocení citlivosti nádorové populace k chemoterapeutikům v ex vivo podmínkách.

Ex vivo testy představují naději, s níž by predikce citlivosti nádoru k vybraným chemoterapeutikům umožnila výběr co nejefektivnější léčby nádorových onemocnění za současné minimální zátěže pacienta. Možnost vytipování účinné látky na základě jednoduchého ex vivo testu by navíc jednoznačně zvýšila úspěšnost léčby při selhání standardní chemoterapie či v případě léčby primárně chemorezistentních nádorů.

Nejrozšířenější metodou ex vivo stanovení citlivosti k chemoterapeutikům je tetrazoliový test (MTT test) (Black a kol., 1954, Mosmann, 1983, Carmichael a kol., 1987). Metoda MTT testu je založena na izolaci buněk vzorku nádorové tkáně a

jejich následné kultivaci ex vivo s vybranými cytostatiky o různých koncentracích. Metodika testu byla na pracovišti Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) zavedena v průběhu roku 2003 za účelem využití jejích výsledků v klinické praxi. Plně rutinní podoby pak test nabyl od počátku roku 2004. Zpočátku byla testována citlivost všech dostupných vzorků bez omezení diagnózy. V průběhu roku 2006 bylo spektrum testovaných diagnóz účelně redukováno a v současnosti je standardně testována citlivost k chemoterapeutikům u vzorků sarkomu, karcinomu ledvin, melanomu a karcinomu vaječníku.

MTT test představuje zdánlivě jednoduchý proces pro stanovení citlivosti izolovaných nádorových buněk k cytostatickým látkám ex vivo, nicméně metoda sama je pouze nástrojem, který při nesprávném použití může vést k získání falešných výsledků. Výsledky MTT testu na MOÚ v období 09/2006-11/2007 vyvolaly novou diskusi týkající se vlastního laboratorního provedení a limitujících kroků metodiky, která vyústila dalšími změnami v postupu metody.

V období 09/2006 – 06/2007 bylo v laboratoři chemorezistence MOÚ zpracováno celkem *109 vzorků nádorové tkáně* s cílem určit citlivost jejich buněk ke spektru cytostatik dle diagnózy. Bylo mezi nimi 29 vzorků sarkomů, 30 vzorků karcinomů ledvin, 16 vzorků karcinomu vaječníku, 13 vzorků melanomu a 21 vzorků nádorů jiných diagnóz.

Pouze z 64 vzorků (59 %) byl získán dostatek živých buněk pro následnou kultivaci alespoň s jedním požadovaným cytostatikem. Třetina vzorků (20 vzorků z 64) byla kultivována s omezeným počtem cytostatik. Příčiny nízké výtěžnosti vzorků spočívaly v malém objemu vzorku či převaze mrtvých buněk v získané suspenzi. U 64 vzorků bylo celkově provedeno *290 kultivací*, pouze však *133 (46 %) z nich vedlo k úspěšnému hodnocení citlivosti*. 16 vzorků bylo shledáno citlivých k 1-3 vybraným cytostatikům, 32 vzorků rezistentních k 1-3 cytostatikům, u 12 pak byla zjištěna rezistence k více než 4 hodnoceným cytostatikům.

Problémy testu

a) izolace buněk ze vzorku nádorové tkáně

Vlastní vzorek tkáně je mechanicky homogenizován, uvolněné buňky jsou následně purifikovány a je stanoven počet izolovaných živých buněk. V případě dostatečného objemu suspenze je citlivost hodnocena ke všem požadovaným cytostatikům dle diagnózy. Při nedostatku živých buněk je citlivost hodnocena pouze k vybraným cytostatikům dle diagnózy a stanoveného pořadí, nebo není u daného vzorku hodnocena vůbec.

Celkové množství izolovaných buněk ze vzorku nádorové tkáně je však velmi individuální a odvíjí se od charakteru vzorku. Výtěžnost vzorku je hodnocena na základě zastoupení živých buněk v získané suspenzi. *Neexistuje žádná závislost mezi objemem výchozího materiálu a počtem izolovaných buněk. Ani minimální časová prodleva mezi odběrem a zpracováním vzorku není zárukou úspěšné izolace živých buněk a mnohdy vzorek nemůže být dále kultivován kvůli převládajícím mrtvým buňkám v suspenzi. Jak je patrné, není možné určit žádný klíčový faktor, s jehož pomocí by bylo možno zajistit úspěšnost izolace živých buněk ze vzorků nádorové tkáně. Izolačním postupem není možné zcela oddělit mrtvé buňky ze suspenze, ty jsou tedy v rámci suspenze převedeny do kultury, kde tvoří slabší či silnější pozadí.* Důvodem časté převahy mrtvých buněk ve vzorku může být jejich zvýšená citlivost na stresové podmínky změny prostředí, poškození vlastním mechanickým zpracováním vzorku, předchozí léčba pacienta, atd.

Získání homogenní suspenze je nezbytné pro zajištění stejného počtu kultivovaných buněk ve všech srovnávaných jamkách. Avšak v některých případech je úplné rozrušení buněčných shluků prakticky nemožné. *Enzymatické rozrušení tkáně* v případě rigidních vzorků nádorů již bylo minulosti testováno, avšak bez významnějšího efektu, proto nebyl tento krok do postupu izolace vůbec zaveden. Kvůli přítomnosti shluků ve výchozí suspenzi pak není možno zajistit shodný počet buněk v jednotlivých jamkách kultivační desky, který je jedním z klíčových

předpokladů úspěšného hodnocení. Shluky mohou být, bohužel jen částečně, odstraněny krátkodobou centrifugací či sedimentací.

Vlastní proces izolace buněk ze vzorku nijak neselektuje nádorové buňky a suspenze buněk použita pro kultivaci ex vivo pak představuje heterogenní populaci nádorových a normálních buněk, které v různé míře přispívají svými hladinami metabolismu k výsledné hodnotě absorbance a ke konečnému hodnocení. Byly popsány metody purifikace nádorových buněk (Shimoyama a kol., 1989; Yamaue a kol., 1991, 1992), nicméně ani jedna z nich není stoprocentním nástrojem pro získání čisté suspenze nádorových buněk.

Metoda násobné gradientové centrifugace (Yamaue a kol., 1991, 1992) je kvůli své nízké výtěžnosti zcela nepoužitelné pro získání „vysokého“ počtu buněk. Purifikace nádorových buněk ze suspenze na základě rozdílné tendence buněk přisedat na pevné kultivační povrchy (Shimoyama a kol., 1989) taktéž nezaručuje dostatečnou separaci nádorových buněk, ba naopak může být zdrojem selekce uvnitř jejich populace.

b) kultivace buněk ex vivo s vybranými cytostatiky

Izolovaná suspenze buněk je přenesena do kultivační desky a buňky jsou kultivovány 72 hodin při 37 °C a 5 % CO₂ s cytostatiky řaděnými na 6 odlišných koncentracích. Následně je k buňkám přidán substrát, který metabolizován pouze živými buňkami umožní sledovat vliv cytostatika. Výsledek chování buněk za jednotlivých podmínek stanovený jako absorbance při určité vlnové délce (450 nm) umožní sestavit křivku přežití a stanovit EC₅₀, z níž je možno odvodit citlivost vzorku k danému cytostatiku. Namísto klasického MTT substrátu je v tomto případě používána reagentie WST-1 (Roche), která metodu vyhodnocení zjednodušuje a urychluje (Yano a kol., 1994; Takenouchi a kol., 1995).

Na optimální dobu přidání látek do kultury existují různé pohledy. Při přenosu do ex vivo kultury jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám, které mohou snížit životaschopnost izolovaných buněk, a tak zkreslit výsledky účinku cytostatických látek přidávaných ke kultuře bezprostředně po izolaci. Zůstává však zachován původní

profil buněk. Při několikadenní adaptaci buněk v kultuře ex vivo bez cytostatik jsou sice sníženy akutní stresové faktory spojené s explantací, na druhé straně dochází k jisté selekci a do kontaktu s cytostatiky tak přichází již neadaptovanější populace, která se může genotypově i fenotypově lišit od původního nádoru.

Při prvotním záměru MOÚ testovat citlivost na chemoterapeutika u širokého spektra diagnóz a tedy vysokého počtu vzorků se jevílo výhodným dopředu připravovat kultivační desky s kultivačním médiem a roztoky cytostatik ředěných v kultivačním médiu a skladovat je při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do momentu jejich použití. Zmražení však mělo za následek znehodnocení kultivačního média, ovlivnění celkových absorbancí v jednotlivých jamkách a tím pádem i výsledku testu. Dalším negativním faktorem tohoto postupu byla nevyhnutelná kombinace kultivačních médií různého stáří a tím pH v rámci desky (změna pH kultivačního média v čase je pozorovatelná změnou jeho barvy díky obsahu fenolové červeni), což také přispělo k odchýlkám absorbance v jednotlivých jamkách. Mezi nestandardní postupy lze jmenovat i nesprávné skladování cytostatických látek a to dlouhodobě (byť při nízké teplotě) ředěné v kultivačním médiu.

Na základě zjištěných nedostatků byly postupně provedeny změny ve standardním operačním protokolu metody, čímž byla spolu se správnou manipulací zabezpečena i minimální degradace účinných látek.

c) hodnocení citlivosti vzorku

Hodnocení testu je prováděno v programu Chemorezist 1.0 (Regner a kol., 2000) a jeho výsledkem je odvození EC_{50} pro jednotlivá cytostatika. Samotná kultivace ex vivo pro buňky představuje stresové podmínky, které mohou ovlivnit jejich životaschopnost a intenzitu metabolismu. Stanovení citlivosti u slabě rostoucích či metabolizujících kultur pak není možné, neboť výstupní hodnoty absorbancí jsou mnohem více zatíženy drobnými odchýlkami v počtu buněk v suspenzi, kterým není možné se vyhnout, není tak možno odvodit EC_{50} a získaná data je lze nazvat jako „nesmyslná“. Citlivost vzorku k danému chemoterapeutiku je tak často nehodnotitelná, což významně tak snižuje celkovou úspěšnost testu.

Závěr

Nádorová tkáň představuje velmi heterogenní materiál, pro něhož je typické zastoupení normálních a nádorových buněk v různém poměru. Každý vzorek byť se stejnou diagnózou představuje jedinečnou tkáň odrážející individuální spektrum poškození normálních buněk vedoucích k maligní transformaci a individuální vývoj nádoru.

Celková úspěšnost testu je předurčena zejména vzorkem samotným, tedy množstvím živých buněk a jejich schopností odolat stresovým podmínkám při zpracování vzorku a chováním v podmínkách *ex vivo*. Kromě problematického výchozího materiálu však i drobné chyby v provedení metodiky mohou samotné či v kombinaci ovlivnit kvalitu získaných dat a tím i výsledek testu. Nicméně jako každá metodika, má i MTT test své limity. Není pomocí něj možno odlišit cytotoxický a cytostatický účinek na kultivované buňky a celkový výsledek testu může být značně ovlivněn přítomností vysokého procenta normálních buněk v kultuře.

Je nutno poznamenat, že *ex vivo* testy nemohou dostatečně napodobit podmínky lidského těla. Konečné vyhodnocení vzorku jako citlivého k určitému cytostatiku na základě *ex vivo* testu proto ještě nemusí nutně znamenat, že pacient bude na nasazenou léčbu úspěšně reagovat. Samotný princip metody je prostý a logický a takto jej lze velmi dobře aplikovat při studiích na buněčných liniích. Nicméně hodnocení citlivosti heterogenní buněčné populace izolované z nádoru jen velmi slabě odráží skutečné vlastnosti nádorových buněk a nádoru jako celku co do odpovědi na přítomnost cytostatických látek.

Pokud je k výsledkům MTT testu přihlíženo jako k poslední možnosti volby potenciálně účinného cytostatika, kdy standardní způsoby léčby nejsou účinné a pacient již prošel několika fázemi chemoterapie, je třeba brát v úvahu, že původně stanovený účinek látky bude již do značné míry zkreslen adaptací odolávajících nádorových buněk. Rezistentní nádorová populace nemusí nutně vzniknout pouze dlouhodobou selekcí, ale naopak může být výsledkem rychlé aktivace molekulárních mechanismů zvýšené exprese genů rezistence či inhibice exprese cílových genů spojených s maligním potenciálem buněk (Di Nicolantonio a kol., 2005).

Reference:

1. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
2. Black, M.M., Speer, F.D. (1954): Further observation on the effects of cancer chemoterapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. *J Natl Cancer Inst*, 14: 1147-1158.
3. Carmichael, J., De Graff, W., Gazdar, A., Minna, J., Mitchell, J. (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semi-automatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47: 936-942.
4. Yano, T., Teruya, K., Shirahata, S., Watanabe, J., Osada, K., Tachibana, H., Ohashi, H., Kim, E.H., Murakami, H. (1994): Ras oncogene enhances the production of a recombinant protein regulated by the cytomegalovirus promoter in BHK-21 cells. *Cytotechnology*, 16(3): 167-78.
5. Takenouchi, T., Munekata, E. (1995): Trophic effects of substance P and beta-amyloid peptide on dibutyryl cyclic AMP-differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Life Sci*, 56(26): PL479-84.
6. Regner, B., Dušek, L., Hajdúch, M. (2000): Software chemorezist (verze 1.0) - komplexní nástroj pro analýzu dat a management testů chemorezistence nádorů. *Klinická onkologie*, 13(zvl. č. 2): 30-32.
7. Yamaue, H., Tanimura, H., Tsunoda, T., Tani, M., Iwahashi, M., Noguchi, K., Tamai, M., Hotta, T., Arii, K. (1991): Chemosensitivity testiny with highly purified fresh human tumour cells with the MTT colorimetric assay. *Eur J Cancor*, 27, 1258-1263.
8. Yamaue, H., Tanimura, H., Noguchi, K., Tani, M., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Tamai, M., Iwakura, S. (1992): Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumour cells using MTT assay. *Br J Cancer*, 66, 794-799.
9. Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M., Ishibiky, K., Abe, O. (1989): Predictibility of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol*, 41, 12-18.
10. Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA et al.: (2005): Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer*. ;5:78.

Publikační aktivita 2007:

1. Michalová Eva, Němečková Ivona, Valík Dalibor, Nenutil, Rudolf, Vojtěšek Bořivoj. Cytotoxický MTT test – boj za kvalitnější data a vyšší úspěšnost metody. In Edukační sborník XXXI. Brněnské onkologické dny, 23. – 25.4.2007, Brno, ČR. Masarykův onkologický ústav, 2007, str. 64-65, ISBN 978-9780-86793-09-2.

Banka nádorového a biologického materiálu

Řešitel : MUDr. R.Nenutil, PhD

Banka biologického materiálu je v plném provozu. Během roku 2007 byly uloženy a katalogizovány hluboce zamrazené vzorky nádorů od 650 pacientů, vzorky sér od 600 pacientů. Nejvíce zastoupenými diagnózami v bance jsou mammární nádory 274 (45%), nádory střev 71 (12%), nádory gynekologické 52 (9%), nádory ledvin 42 (7%).

Z banky bylo výzkumným skupinám vydáno 210 alikvotů sérových vzorků pro 5 studií intramurálních žadatelů a 244 alikvotů tkáňových vzorků pro 13 studií intramurálních žadatelů a jednoho žadatele extramurálního.

Publikace :

Knoflíčková D., Šimíčková M., Šmerdová T., Žaloudík J.: Úloha banky biologického materiálu v onkologii. Změna archivace vzorků v Masarykově onkologickém ústavu XXXI. Brněnské onkologické dny. Brno 2007. Edukační sborník s. 342. ISBN 978-9780-86793-09-2

..

Cirkulující biomarkery

Řešitel: Mgr. Lenka Dubská, PhD.

ANGIOGENEZE:

Bylo zavedeno a je prováděno rutinní vyšetřování cirkulující endoteliálních buněk a jejich subsetů u pacientů léčených anti-angiogenní terapií i konvenční chemoterapií, především s diagnózou kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a karcinomu ledvin, a u dětských pacientů se solidními nádory (ve spolupráci s KDO FN Brno). Je prováděn sběr klinických dat o těchto pacientech.

Jsou upřesněny požadavky na materiál vhodného pro hodnocení solubilních angiogenních markerů na základě imunoarray-angiogeneze i z hlediska vybraných angiogenních faktorů a to CTAD-plazmy.

Je prováděn Sběr CTAD-plazmy ne-onkologických dárců a stanovení normálních referenčních rozmezí některých solubilních angiogenních faktorů.

IMUNOLOGIE:

Zavedení nových ukazatelů statutu imunitního systému pro rutinní vyšetření: CD64 na granulocytech z hlediska onkologických pacientů především pro diferenciální diagnostiku infektů (bakterie, mykózy) v terénu paraneoplasticky zvýšeného CRP.

Studium Th1 a Th2 cytokinů z hlediska vývoje onkologického onemocnění, primárně stanovení normálních referenčních hodnot metodou flowcytomix u IFN- γ , IL-12p70, IL-2, IL-10, IL-8, IL-6, IL-4, IL-5, IL-1 β , TNF α .

Vypracování postupu stanovení T regulačních lymfocytů v periferní krvi.

Publikace :

Dubská L (2007): Circulating endothelial cells and precursor cells as predictors of cancer spread and metastasis: Pilot data on colorectal and breast cancer.

Tumor Biology 28(S1): 35.

Frgala T, Dubská L, Reynolds CP (2007): Retinoidy v léčbě neuroblastomu. Klinická onkologie. 20: 311-313.

Dubská L, Pospíšilová E., Valík D.: Regulační T-lymfocyty u pacientů s kolorektálním karcinomem a maligním melanomem: nová strategie detekce. Edukační sborník XXXI Brněnské onkologické dny 2007, Brno.

Dubská L, Bačíková L., Valík D.: Souběžná kvantifikace 10 Th1/Th2 cytokinů pomocí průtokové cytometrie: onkologický náhled a technická zpráva. Edukační sborník XXXI Brněnské onkologické dny 2007, Brno.

Proteomika nádorů

Řešitel : Mgr.J. Holčáková

Proteomická analýza karcinomů ledvin

Projekt byl dokončen. Byl identifikován protein B crystallin, který je signifikantně zvýšen v nádorové tkáni ledvin, což bylo potvrzeno i imunohistochemicky. Projekt byl zpracován jako publikace J. Holcakova, L.Hernychova, P.Bouchal, K.Brozkova, J.Zaloudik, D.Valik, R. Nenutil, B. Vojtesek. *Identification of B-crystallin, a biomarker of renal cell carcinoma by SELDI-TOF MS.* , která je nyní v oponentním řízení časopisu International Journal of Biological Markers

Technologií SELDI-TOF byl analyzován soubor 10 vzorků karcinomu ledvin a 10 zdravých tkání ledvin. Porovnáním proteinových spekter získaných aplikací dvou typů proteinových čipů CM-10 a Q-10 byly nalezeny píky specifické pro nádorovou či zdravou tkáň. Při použití čipů CM-10 byl nalezen pík o velikosti 4 933 Da výrazně zvýšený pro nádorovou tkáň a o velikosti 20 234 Da pro zdravou tkáň. Při použití čipu Q-10 byly nalezeny signifikantní píky pro karcinom o velikosti 20 165 Da a pro zdravou tkáň 8 965, 9 617 a 10 638 Da. Z těchto proteinů se podařilo pomocí MALDI-TOF identifikovat pouze pík o 20 165 Da jako B crystallin. Správnost identifikace byla ověřena imunohistochemickým barvením. Zvýšená hladina B crystallin jako potenciální biomarker pro karcinomy ledvin byla již nezávisle potvrzena jinými metodami jako 2D elektroforéza v již publikovaných studiích.

Proteomická analýza karcinomů prsu.

Dosud byla metoda SELDI-TOF používána u případů karcinomů prsu převážně k analýze proteinových spekter získaných z krevní plazmy nebo séra. Kvůli omezené citlivosti této metody jsme se rozhodli přednostně analyzovat přímo nádorovou tkáň, která by měla být hlavním zdrojem proteinů spojených s nádorovým procesem. Optimalizovali jsme postupy pro zpracování větších souborů tkáňových vzorků a statistické vyhodnocování získaných proteinových spekter. Protože nebyla dosud úspěšně vyřešen postup pro snadnou a 100% identifikaci požadovaných proteinů z tkáňových lyzátů, zaměřili jsme se na získávání informací z variabilních proteinových profilů nádorů ve vztahu s klinicko-histopatologické parametry. Výsledky byly zpracovány do publikace *K.Brozkova, E.Budínska, P.Bouchal, D.Knoflickova, D.Valik, R.Vyzula, B. Vojtesek, R.Nenutil: SELDI-TOF proteomic profiling of breast carcinomas identifies clinicopathologically relevant groups of patients similar to previously defined clusters from cDNA expression*, která je nyní v oponentním řízení časopisu Breast Cancer Research

V projektu bylo analyzováno 105 karcinomů prsu a odpovídající zdravé tkáně na proteinových čípech IMAC 30. Pomocí klastrové analýzy proteinových spekter bylo možné vytipovat proteinové profily odpovídající různým klinicko-patologickým variantám a nádorovým markerům. V každém lyzátu bylo nalezeno průměrně 130 vrcholů, které byly hierarchickým klastrováním rozděleny do 6 klastrů. Na jejich základě byly pacienti rozděleni do 5 skupin, které se významně lišily v typu nádoru, stupni diferenciaci, přítomnosti hormonálních receptorů, mucinu 1 a cytokeratinů 5/6 a 14. Naše výsledky, na základě proteomických přístupů, potvrzují podobné rozdělení nádorů jaké již bylo identifikováno podle cDNA expresních profilů u karcinomů prsu. S využitím SELDI-TOF technologie jsme karcinomy prsu rozdělili rovněž do skupin, které se shodují s již publikovanými skupinami označovanými jako lumenální typ A a B, bazální a HER2 karcinomy. Tento fakt potvrzuje oprávněnost použití metody SELDI-TOF pro zpracovávání podobných studií.

Hledání proteomických biomarkerů časného metastazování do lymfatických uzlin u dobře diferencovaných karcinomů prsu.

Projekt je zaměřen na hledání proteinů, a tedy i potenciálních biomarkerů, spojených s procesem metastazování do lymfatických uzlin u low grade karcinomů prsu. Pro tyto účely bylo zpracováno 96 vzorků karcinomů prsu, z toho 54 nemetastazujících karcinomů (T1N0M0, G1) a 37 metastazujících karcinomů (T1N1-2M0, G1). U 5 pacientek s metastazujícími nádory byly k dispozici také vzorky metastází. Odběr tkání byl v rozmezí let 2000-2006, přičemž 16 metastazujících a 17 nemetastazujících karcinomů odebraných 2005-2006 vykazuje homogennější proteinové profily.

Analýza tkáňových lyzátů byla provedena pomocí metody SELDI-TOF MS na proteinových čípech IMAC30 a získaná proteinová spektra byla kvantitativně a statisticky zpracována Mann-Whitney testem. Po statistických vyhodnoceních byly vybrány potenciální markerové proteiny pro metastazující a nemetastazující karcinomy:

M=11080 1,6x zvýšený u metastazujících nádorů při $p=0,001$

M=11726 1,4x zvýšený u metastazujících nádorů při $p=0,001$

M= 7869 1,9x zvýšený u nemetastazujících nádorů při $p=0,01$

Proteiny specifické pro metastazující karcinomy byly nalezeny také v lyzátu tkáně metastáz.

Nyní laboratoř hledá vhodný způsob pro identifikaci vytipovaných proteinů přímo z celkového lyzátu.

Rozdíly mezi směsnými vzorky metastazujícího a nemetastazujícího karcinomu prsu byly zkušebně analyzovány pomocí metody iTRAQ-2D-LC-MS/MS. Tato metoda je velmi citlivá a umožňuje identifikovat téměř všechny proteiny v analyzovaném vzorku. Zároveň je možno určit i poměrné zastoupení identifikovaných proteinů. Nicméně je tato metoda časově i metodicky velmi náročná a lze naráz zpracovávat velmi omezené množství vzorků.

V tkáňových lyzátech se podařilo *identifikovat celkem 609 proteinů, z nichž 9 bylo shledáno významně zvýšených u metastazujících karcinomů*. Tyto proteiny jsou nyní předmětem dalších analýz, které se snaží objasnit potenciální funkci těchto proteinů v metastatickém procesu. Výsledky studie jsou připravovány formou publikace.

Optimalizace postupů zpracování klinických materiálů pro aplikaci SELDI-TOF

V práci *Greplová K., Pilný R., Dubská L., Brožková K., Michalová E., Vojtěšek B., Žaloudík J., Vyzula R., Nenutil R., Valík D. SELDI TOF hmotnostní spektrometrie v onkologickém výzkumu: pilotní metodická data a potenciální klinické aplikace*, která je nyní v oponentním řízení v časopisu *Klinická chemie a metabolismus*, prezentujeme naše dosavadní výsledky práce s hmotnostním spektrometrem SELDI-TOF týkající se přípravy a analyzovatelnosti jednotlivých druhů biologického materiálu obecně studovaných v onkologickém preklinickém výzkumu (sérum, plasma, buněčné frakce, nativní tkáň). Studovali jsme vliv různých podmínek na získaná proteinová spektra a hledali optimální postupy pro získání reprodukovatelných výsledků.

Sledovány byly následující podmínky a jejich vliv na výsledky získané metodou SELDI-TOF:

1. vliv prefrakcionace séra pomocí izoelektrické fokusace
2. vliv koncentrace urey na stupeň denaturace proteinu
3. vliv koncentrace dithiothreitolu na imunologický test
4. vliv teploty a času na tvorbu krystalů matrice
5. srovnání sorpčních povrchů proteinových čipů na kvalitu získaných proteinových spekter

Všechny tyto parametry významně ovlivňovaly profily i kvalitu proteinových spekter. Podmínkám při přípravě vzorků je nutné věnovat zvýšenou pozornost, protože velkou měrou mohou ovlivnit konečný výsledek analýzy SELDI-TOF.

Proteomická analýza signální dráhy p53

V projektu jsme se věnovali hledání vhodného fyziologického modelu pro studium evoluce a funkce proteinu SEP53 a jeho signální dráhy iniciované stresem u dlaždicového epitelu.

Výsledkem naší mezinárodní spolupráce je publikace L.Nelson, S. Anderson, A.Archibald, S.Rhind, A.Condie, N.McIntyre, J.Thompson, R.Nenuřil, B.Vojtesek, B.Whitelaw, T.J. Little, and T. Hupp. Expression of the Stress Response Protein SEP53 is Elevated in Porcine Oesophageal Bile Reflux Disease, která je nyní v oponentním řízení časopisu Cell Stress and Chaperones.

Dlaždicový epitel savců vykazuje atypickou stresovou odpověď zahrnující regulaci stresového proteinu HSP70 a indukující soubor proteinů včetně proteinu SEP53. Tato atypická stresová odpověď je pravděpodobně způsobena neobvyklými tlaky, způsobenými kontaktem dlaždicového epitelu s vnějším prostředím.

SEP53 je antiapoptotický faktor, který hraje roli i v imunitní odpovědi. Tkáň dlaždicového epitelu, jako fyziologický model, umožňuje definovat regulaci a funkci tohoto proteinu.

Tato práce se zabývá:

1. klonováním a sekvenováním prasečího SEP53
2. potvrzením variability C-koncové části genu u různých savců
3. potvrzením funkce konzervativní N-koncové části genu, která zajišťuje lokalizaci proteinu v cytoplazmě
4. analýza exprese SEP53 v normální a nemocné tkáni jícnu prasat

Expresi proteinu SEP53 je v prasečí tkáni omezena na dlaždicový epitel trávicího traktu s konzistentní hladinou ve zdravé tkáni. Imunohistochemické barvení prokázalo signifikantní stabilizaci SEP53 v poškozené tkáni jícnu. Dosažené výsledky potvrzují, že prasečí dlaždicový epitel je vhodným fyziologickým modelem pro studium funkce a evoluce SEP53 a jeho signální dráhy, jako součást odpovědi na stres v epitelové tkáni.

Microarrays

Řešitel : Dr. R. Hrstka

Cílem projektu je využít metodu "cDNA/oligo GEArray" k analýze exprese genů v přesně definovaném klinickém materiálu, který již byl zpracováván v rámci jiných studií prováděných na MOÚ. Projekt „Mircoarrays“ sestává z několika dílčích projektů:

a) Sledování změn transkripčních expresních profilů po působení různých protinádorových agens, jejichž mechanismus účinku je založen na poškození DNA. Konkrétně byly analyzovány a porovnávány expresní profily p53 signálních genů na modelových buněčných liniích po působení cisplatinou, LA-12 a doxorubicinem. Hlavním výstupem této práce je skutečnost, že LA-12 indukuje unikátní expresní profily p53 signálních genů, v porovnání s cisplatinou a doxorubicinem. LA-12 je mnohem účinnější cytotoxické agens nejen v případě nádorových buněk s nefunkčním p53 ale i u nádorů manifestujících rezistenci k cisplatině.

b) Byla započata studie zaměřená na analýzu změn exprese p53-signálních genů v definovaných souborech karcinomů prsu. Cílem tohoto dílčího projektu jsou pilotní studie:

1. Stanovení exprese genů regulovaných i regulujících estrogenní receptory u biopsií pocházejících z primárních karcinomů prsu sesbíraných na MOÚ v období 2004-2005. Vzorky jsou rozděleny do tří skupin podle statutu cyklinu D1, jehož amplifikace případně i zvýšená exprese jsou často spojovány s rezistencí k anti-hormonální adjuvantní léčbě. Momentálně jsou vzorky zpracované a je třeba získaná data statisticky zpracovat.

2. Druhá pilotní studie vychází ze stejné sestavy karcinomů prsu, avšak budou analyzovány karcinomy nesoucí wt p53. V rámci tohoto souboru byly na základě imunohistochemického barvení vyčleněny 2 poměrně vzácně se vyskytující skupiny karcinomů vykazující rozdílnou expresi p53 (vysoká heterogenní exprese versus nízká heterogenní exprese). V rámci takto definovaných skupin budou porovnávány exprese p53 signálních genů. V dané chvíli je zpracováno 6 vzorků a v kooperaci s patologií se pracuje na rozšíření tohoto souboru.

b) Stanovení prognózy a predikce léčebné odpovědi u pacientů s kolorektálním karcinomem. V této studii jsme navázali na pilotní studii z minulého roku publikovanou v Klinické onkologii. Soubor byl rozšířen z 12 na 24 pacientů (12 s dobrou prognózou - DFS > 12 měsíců, 12 se špatnou prognózou - DFS < 12 měsíců). Pomocí Cancer SuperArrays byla stanovena relativní exprese 440 genů souvisejících s biologii primárních nádorů kolorekta. Pomocí nově zakoupeného softwaru J-Express na analýzu genomických dat, jsme identifikovali skupinu genů rozdílně exprimovaných mezi pacienty s různou prognózou (např. hypoxií up-regulovaný HYOU1, podjednotku proteasomu PSMA1 nebo hyaluronidasu) Rozdíly v expresi těchto genů v současnosti validujeme na souboru 70 pacientů s kolorektálním karcinomem metodou PCR v reálném čase. (V souvislosti s tímto projektem vyšel přehledový článek v Klinické onkologii)

c) Korelace hladin vybraných mikroRNA s klinicko-patologickými charakteristikami kolorektálního karcinomu: po úspěšném zavedení varianty metodiky real-time PCR pro kvantifikaci mikroRNA jsme provedli studii zaměřenou na korelaci hladin vybraných mikroRNA (miR-21, miR-31, miR-143 a miR-145) s klinicko-patologickými charakteristikami kolorektálního karcinomu. Identifikovali jsme silnou závislost mezi hladinami miR-21 a klinickým stádiem onemocnění. Hladina miR-21 byla statisticky významně vyšší v nádorech pacientů s postižením uzlin ($p=0,025$) a rozvinutým metastatickým postižením ($p=0,009$). Tyto výsledky byla přijaty k publikaci v časopise Oncology. O problematice mikroRNA v onkologickém výzkumu jsme rovněž sepsali přehledovou práci, která vyjde v lednu 2008 v Časopise lékařů českých. V současné době rozšiřujeme soubor pacientů a spektrum sledovaných mikroRNA a provádíme funkční studie zabývající se významem miR-21 na tkáňových kulturách kolorektálního karcinomu včetně sensitizace buněk k různým cytostatickým režimům.

Analýza methylace DNA

Řešitel : Dr.R.Hrstka

Stanovení methylace promotoru MGMT (O6-methylguanin DNA methyltransferáza), kdy se předpokládá lepší prognóza pacientů s „high grade“ gliomem léčených

pomocí alkylačních agens (temodal). Byla úspěšně optimalizována izolace DNA z parafinových bloků a stanovení metylace bisulfitovým značením jak v nativním materiálu tak i v parafinových blocích (obr. 1). Rozbíhá se pilotní studie na materiálu v parafinových blocích získaných asi ze 40 pacientů s diagnózou „high grade“ gliomu a se známou odpovědí na léčbu.

Zahájena je studie detekce metylace v promotoru BRCA1 u tzv. „Basal-like karcinomů“, kdy právě v případě metylace wt BRCA1 genu by se nabízela jako vhodnější léčba alkylačními agens. Projekt se nachází ve fázi shromažďování vhodných vzorků.

Dále je do podprojektu zařazeno stanovení a význam metylace promotoru E6 genu lidského papillomaviru 16 v intraepiteliálních lézích a karcinomech děložního čípku. Cílem našeho projektu je stanovit frekvenci výskytu HPV 16 a 18 nejen u pacientek s CIN a karcinomem děložního čípku ale i u náhodně vybraného vzorku populace asymptomatických žen. Následně u HPV16 pozitivních vzorků chceme prokázat význam metylace E6 genu HPV16 pro vznik a progresi nádorového onemocnění a vyjádřit tak individuální riziko pro ženy infikované HPV16. V naší práci nejprve detekujeme přítomnost HPV 16 a 18 pomocí PCR s nově navrženými, vysoce specifickými primery. Jako kontroly používáme nádorové cervikální linie SiHa (HPV16 pozitivní), HeLa (HPV18 pozitivní) a HT3 (HPV negativní). Takto jsme celkem analyzovali 54 kartáčkových stěrů od zdravých žen, kde se pozitivita HPV 16 pohybovala okolo 54 %. U skupin pacientek s jednotlivými patologickými stupni CIN je incidence HPV 16 u CIN I 66 % (n=15); u CIN II 71% (n=14) a u CIN III 85 % (n=131). U karcinomů děložního čípku byla přítomnost HPV 16 prokázána u 65 % případů (n=45). Celková incidence HPV 16 a 18 je u CIN III a karcinomů okolo 85 %. U HPV 16 pozitivních vzorků provádíme stanovení metylace v promotoru genu E6 pomocí specifické endonukleázy McrBc. Methylace E6 genu byla detekována u 73 % negativních stěrů v porovnání s 35 % u skupiny CIN III. Naopak demethylace byla pozorována u 65 % CIN III a 58 % karcinomů oproti 27 % u skupiny asymptomatických žen. Tyto výsledky představují významný rozdíl v zastoupení metylací či demethylací promotorů virových genů během vývoje CIN a neoplastické transformaci spojené se vznikem nádoru a potvrzují tak hypotézu klesajícího zastoupení metylací během progresu CIN.

Publikace a prezentace :

Slabý O., Svoboda M., Fabian P., [et al.]. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer.

Oncology, 2007, in press (IF=2,252)

Hrstka R., Powell D.J., Kvardova V., [et al.]. The novel platinum(IV) complex LA-12 induces p53 and p53/47 responses that differ from the related drug, cisplatin.

Anticancer Drugs. MS prepared for resubmission. (IF=2,245)

Slabý O., Krekáč D., Hrstka R., [et al.]. Zapojení mikroRNA do patogeneze nádorových onemocnění a možnosti jejich využití v diagnostické a prediktivní onkologii. Čas Lék Čes, 2008, in press (IF=0,010)

Slabý O. Pokroky v čipových technologiích znamenají pokroky v biomedicinském výzkumu i klinické diagnostice. Klinická onkologie, Brno : CLSJEP, 2007, 2, od. s. 235-236, 2 s. ISSN 0862-495X.

Hublarová, P.; Rotterová, P.; Rotter, L.; Hortíková, Z.; Badal, Vinay; Nenutil, R.; Vojtěšek, B. Stanovení a význam metylace promotoru genu E6 lidského papillomaviru 16 v intraepiteliálních lézích a karcinomech děložního čípku. In CHLSAC 101 (5) (2007): VII. Mezioborové setkání mladých chemiků a biologů Sigma-Aldrich 12. – 15.6.2007, Milovy, ČR. Česká společnost chemická, 2007, str. 440, ISSN 0009-2770.

Hublarova, Pavla; Rotterova, Pavla; Rotter, Leopold; Hortikova, Zdena; Badal, Vinay; Nenutil, Rudolf; Vojtesek, Borivoj. Determination and signification of E6 gene promoter methylation in human papillomavirus 16 in cervical intraepithelial neoplasia and cervix carcinoma. In Acta Biochimica Polonica, vol. 54 Supplement 5/2007: SENECA (European conference on Cancer and Ageing), 4. – 6. 10. 2007, Warsaw, Poland. Nencki institute of experimental biology, 2007, str. 36 PL ISSN 0001-527X 35 11 13.

Hrstka Roman; Knoflíčková Dana, Holčáková Jitka, Nenutil Rudolf, Vojtěšek Bořivoj. Prognostická relevance proteinů AGR2 a AGR3 při léčbě karcinomu prsu. In Sborník příspěvků: III.dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 28.11-30.11. 2007, Olomouc. vyd. Olomouc : Solen, 2007. , 2007, s. 20. ISBN 978-80-244-1824-7.

Slabý O., Svoboda M., Garajová I. et al: Prediction of sensitivity of locally advanced rectal adenocarcinomas to neoadjuvant combined therapy with fluoropyrimidines and concomitant radiotherapy by low-density oligonucleotide arrays. In 3rd Symposium & Workshop on Molecular Patology, Book of Abstracts. Olomouc : UP Olomouc, 2007. od s. 29-29, 1 s. ISBN 978-80-244-1677-9.

Slabý O., Hrstka R., Dubská L., Svoboda M. et al: Význam mikroRNA-21 v patogenezi kolorektálního karcinomu. In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. 2007. vyd. Olomouc : Solen, 2007. s. 15-15. ISBN 978-80-244-1824-7.

Slabý O., Garajová I., Svoboda M. et al: Moderní molekulárně-biologické přístupy ke stanovení prognózy u pacientů s kolorektálním karcinomem. In III. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. 2007. vyd. Olomouc : Solen, 2007. s. 25-25. ISBN 978-80-244-1824-7.

Slabý O., Fabian P., Garajová I., Svoboda M., Svoboda M., Srovnal J., Hoch J., Vyzula R. Association of extracellular matrix gene expression with fraction volumes of particular cell populations in bioptic sample and lymph node metastasis in colorectal cancer. In XI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Sborník příspěvků. Brno : Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4234-6.

Slabý O., Svoboda M., Garajová I. et al: Využití profilů genové exprese ke stanovení prognózy a predikci léčebné odpovědi u pacientů s kolorektálním karcinomem. In 51. Studencká vědecká konference. Program a abstrakta. 2007. vyd. Brno : Lékařská fakulta Masarykovy univezity v Brně, 2007. s. 53-53.

Slabý O., Svoboda M., Fabian P., Svoboda M., Garajová I., Šachlová M., Šmerdová T., Knoflíčková D., Vyzula R: Association of miR-21, miR-31, miR-143, miR-145 and

let-7a-1 levels with histopathologic features of colorectal cancer. Eur J Cancer, 5, 4 (suppl.), od s. 78-79, 2 s. ISSN 0959-8049. 2007. (IF=4,167)

Slabý O., Svoboda M., Fabian P. et al: Correlation of selected microRNAs with histopathologic features of colorectal cancer. In ANALYTICAL CYTOMETRY IV. BOOK OF ABSTRACTS. Brno : Czech Society for Analytical Cytology, 2007. od s. 131-131, 1 s. ISBN 978-80-239-9591-6.

Slabý O., Svoboda M., Garajová I. et al: Zapojení vybraných mikroRNA do patogeneze kolorektálního karcinomu a jejich korelace s klinicko-patologickými charakteristikami. In Edukační sborník. XXXI. Brněnské onkologické dny s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty. Brno : Masarykův onkologický ústav, 2007. od s. 358-359, 2 s. ISBN 978-9780-86793-09-2.

Studium signální drah zhoubných nádorů

Řešitelé : prof. RNDr. PhMr. J.Kovařík,DrSc., RNDr.V.Boudný,CSc.

V kontextu se zaměřením výzkumu na studium mechanismů buněčné signalizace proteiny rodiny STAT včetně jejich specifických inhibitorů rodiny SOCS a na jejich patologické změny, které úzce souvisejí s maligním geno- a fenotypem probíhaly tři níže uvedené studie:

1. V modelu buněk maligního melanomu s různou citlivostí k biologickým účinkům IFN- γ byla provedena analýza souvislostí patologických změn v transkripci genů STAT 1-6, SOCS 1-3 a v indukci aktivace STAT 1 proteinu s citlivostí, respektive rezistencí k tomuto cytokinu.

Studie ukázala, že IFN- γ rezistentní buňky se od citlivých liší konstitutivní expresí SOCS 3 proteinu, absencí, či sníženou aktivovatelností SOCS 1-3 IFN signálem výraznou indukci STAT 1 fosforylace na serinu S727. Práce ukázala, že patologická exprese SOCS genů v buňkách maligního melanomu je jednou z příčin vzniku buněčné rezistence, k účinkům interferonu gamma.

2. V souboru 24 nemocných maligním melanomem jsme analyzovali v ex vivo buňkách z uzlinových metastáz aktivační potenciál transkripčního faktoru a onkogenu STAT 3 po indukci IFN- α / γ a korelovali výsledky s průběhem onemocnění v 5 letém follow-up.

a) IFN- α stimuluje STAT 3 fosforylaci na tyrosinu (Y 701) u 21% nemocných. Tato hyperreaktivní skupina jsou pacienti s nejkratším intervalem progresse choroby.

b) Výsledky ukázaly významnou inverzní korelaci mezi IFN- α indukovanou aktivací STAT 3 faktoru a intervaly relapsu a přežití. Přispěly tak k dalšímu pochopení úlohy STAT 3 transkripčního faktoru v evoluci nádorového procesu a ukázaly možné využití tohoto vyšetření v prognostice onemocnění. Nemocní s indukcí STAT 3 aktivace IFN- α měli ve srovnání s druhou, STAT 3 neindukovatelnou skupinou významně kratší DFS (5 vs 35 měsíců), kratší PFS (26 vs 78 měsíců) a kratší OS (26 vs 78 měsíců). Benefit léčby maligního melanomu IFN- α je v kontextu naší studie velmi diskutabilní.

3. Cílem další studie bylo studium abnormalit v STAT/SOCS signálních drahách v modelu buněčných linií karcinomu mléčné žlázy v relaci k antiproliferativním účinkům IFN- γ . Tato studie je ve stadiu rozpracování.

Citlivost buněk k IFN- γ pozitivně koreluje s indukcí SOCS 3 proteinu a stupněm STAT 1 fosforylace. Výsledky jsou potvrzením hypotézy že exprese a aktivace SOCS 3 a STAT 1 proteinů je nutná pro antiproliferativní účinky interferonu alpha. Studie rovněž ukázala závislost interferonem indukované transkripce SOCS 3 proteinu na statusu ER a PR receptorů.

Publikace a prezentace :

Fojtova M., Boudny V., Kovarik A., Lauerova L., Adamkova L., Jarkovsky J. and Kovarik J.: Development of IFN- γ resistance is associated with attenuation of SOCS genes induction and constitutive expression of SOCS 3 in melanoma cells.

Brit. J. Cancer 2007, 97, 231-237

Adámková L., Součková K., Kovařík J.: Transcription Protein STAT 1: Biology and Relation to Cancer.

Folia Biol. 2007, 53, 1-6

Adamkova L., Kovarik J., Dusek L., Lauerova L., Souckova K., Kovarik A.: Activation of STAT 3 by IFN- α may negatively influence disease progression in melanoma patients. Eur. J. Cancer 2007 – odesláno k recenznímu řízení.

Boudny V., Kovarik A., Fojtova M., Adamkova L., Souckova K., Lauerova L., Jarkovsky J., Kovarik J.: Loss of IFN gamma sensitivity is accompanied by constitutive expression of SOCS3 and attenuation of SOCS genes induction in melanoma. ECCO 14, Barcelona 23-27 září 2007

Abstract in : Eur.J.Cancer 2007, 15, 67

Kovarik J., Lauerova L., Kovarik A., Fojtova M., Souckova K., Adamkova L., Boudny V.: Progression towards IFN resistance is associated with the upregulation of SOCS 3 gene and its decreased inducibility by IFN-gamma in melanoma cell lines.

Interferon Congress, Oxford, UK, 16-19. Září, 2007

Abstract: in: J. Interferon and Cytokine Res., 2007, 27, 725

Souckova K., Humpolikova-Adamkova L., Fojtova M., Lauerova L., Kovarik A., Krejci E., Matouskova E., Bursikova E., Kovarik J. and Boudny V.: Reduced inducibility of SOCS3 by interferon gamma in human breast cancer lines compared to normal mammary epithelial cells.

Int. Congress Oncogenes and Human Cancer, Madrid, 3 – 6 října 2007-12-12

Abstract in : Congress Proc. 2007, p. 319

Adámková L., Boudný V., Součková K., Lauerová L., Sekaninová R., Hošková A., Poláková H., Kovařík J.: Hladiny proteinů STAT 1 a SOCS 3 po indukci interferony v buňkách maligního melanomu.

XXXI Brněnské onkologické dny, 23-25 dubna 2007

Abstract in : Edukační sborník XXXI. BOD 2007 s. 376

Součková K., Krejčí E.: Tissue preservation in RNA later: its suitability and limitations for subsequent immunohistochemical and molecular analyses.

The 3rd symposium and workshop on molecular pathology, Olomouc, 4 – 5 května 2007

DOBI (Dynamic Optical Breast Imaging) – zhodnocení metody

Řešitel: MUDr. H. Bartoňková

V průběhu tří let bylo na Radiodiagnostickém oddělení MOÚ vyšetřeno přes 250 žen metodou DOBI (Dynamic Optical Breast Imaging) jejíž princip spočívá v prosvěcování tkáně prsu zářením, jehož kmitočet je blízký infračervenému světlu. Následně DOBI systém vyhodnocuje nestejně pohlcení světla jednotlivými strukturami či případnými ložisky prsní žlázy. Výsledkem je a barevná „mapa“ plošného obrazu prsu, ze které diagnostik jednak pomocí zobrazené barevné škály, jednak pomocí časové křivky hodnotí pravděpodobnost přítomnosti maligní léze. K vyšetření jsme indikovali jednak a) ženy s nálezem nejistého ložiska z předtím provedené mamografie, b) jednak skupinu tzv. rizikových žen - rizikových z hlediska možného onemocnění prsu maligním nádorem (nosičky genové mutace BRCA1 nebo 2 a současně ženy s empirickým rizikem vzniku zhoubného tumoru prsu 20% a více).

Náš výzkum ukázal, že metoda nemá vyšší citlivost v záchytu maligních novotvarů prsu než klasická rentgenová mamografie (MG), která nadále zůstává nezastupitelnou metodou. Senzitivita vyšetření mléčné žlázy pomocí DOBI se pohybovala pod hodnotou senzitivity mamografie, která na našem pracovišti dosahuje 85-90% . Světová literatura udává průměrnou senzitivitu mamografie 89%. Citlivost DOBI pro záchyt maligních tumorů prsu se pohybovala pod 80% hranicí (u prvních 100 vyšetřených žen 71%, u druhé skupiny vyšetřených žen 74%). Specificita u DOBI byla zřetelně nižší než mamografie, pohybovala se kolem 60%.

Metoda DOBI, určená k diagnostice zhoubných tumorů prsu, je (a bylo tomu tak i ve většině dosud publikovaných prací v zahraničních odborných periodících) vždy srovnávána s mamografií. Na rozdíl od mamografie, která je postavena na využívání průchodu rentgenového záření prsem, se u DOBI používá biologicky zcela neškodná

světelná energie blízká infračervenému záření. Ve srovnání s mamografií je to navíc metoda stejně jednoduchá a poměrně rychlá (jedno vyšetření ženy asi 10 minut u DOBI i MG) vyšetřovanou ženu nezatěžující, nebolestivá, ale současně méně diagnosticky výtěžná. DOBI může být po dalším propracování další komplementární metodou ve vyšetřování nádorů prsu, v současné podobě však mammografii nezastoupí.

Publikace a prezentace :

Bartoňková, H., Standara, M., Schneiderová, M.: Výsledky DOBI vyšetření v Masarykově onkologickém ústavu. Klinická onkologie 18, 2005, str 149-51.

Bartoňková, H., Skovajsová, M.: Mamodiagnostika u mladých nosiček mutace v BRCA1/2 genu. Onkologie v gynekologii a mammologii, 17.-18. ledna 2003, Brno

Schneiderová, M., Bartoňková, H. et al.: Vyšetřování prsu u žen s hereditární zátěží. Onkologie v gynekologii a mammologii, 19.-20. ledna 2007, Brno

Magnetická rezonance prsu

Řešitel : MUDr. M. Schneiderová

Záměr projektu :

- 1) Magnetická rezonance prsu jako screeningová metoda u žen s vysokým rizikem karcinomu prsu.
- 2) Magnetická rezonance prsu jako metoda doplňující předoperační staging karcinomu prsu.
- 3) Magnetická rezonance prsu MR jako metoda ke sledování charakteru neoangiogeneze karcinomu prsu.
- 4) Fyziologické enhancement mléčné žlázy v postkontrastním MR obrazu.

Cíle :

Stanovit optimální využití magnetická rezonance prsu.

Stanovit optimální indikace magnetická rezonance prsu.

Průběžné výsledky za období 1/10/2005 -30/11/2007:

631 MR prsu

292 MR prsu u žen s vysokým rizikem ca prsu („heredita“)

76 MR prsu předoperační staging

263 MR prsu z jiné indikace (1. dif.dg nejasné léze z MG nebo UZ -MaSc i po terapii ca, 2. nepřehledný terén denzní žlázy v MG a UZ a 3. implantáty)

V roce 2007:

297 MR prsu

130 MR prsu u žen s vysokým rizikem ca prsu („heredita“)

25 MR prsu předoperační staging

142 MR prsu z jiné indikace

1) Magnetická rezonance prsu u žen s vysokým rizikem karcinomu prsu - je MR lepší metoda ve srovnání s MG a UZ?.

Ženy BRCA1,2 pozitivní a ženy s empirickým rizikem 20% a více.

Každoročně MR + MG + UZ a UZ za 6 měsíců.

Výsledky: vyšetřeno 190 žen

292 MR vyšetření rizikových žen celkem v období 10/05 - 11/07

130 MR vyšetření rizikových žen za rok 2007 : 51 žen v roce 2007 nově (1. kolo)

66 žen 2. kolo

5 žen 3. Kolo

8 žen kontrolní vyš v kratší době

Záchyt 7 (3,7%) Ca prsu (5x T1b N0 M0, 2x T1c N0 M0)

Metoda záchytu: MR 7 Ca, MG 0, UZ 1 Ca (UZ vyš před 6 měsíci však negativní).

Závěry : Kontrastní magnetická rezonance prsu se jeví jako metoda s nejvyšší sensitivitou pro screening či dispenzarizaci žen s vysokým rizikem karcinomu prsu. Ze 7 zachycených byl karcinom 6 detekován pouze magnetickou rezonancí. Výsledky jsou v souladu s většími publikovanými soubory - na jejich základě ACS v květnu 2007 vydala nová doporučení každoroční MR jako metody první volby pro screening žen s vysokým rizikem karcinomu prsu. Tato indikace využívá vysoké sensitivity MR (90-100%) v detekci invazivního karcinomu a high grade DCIS.

Naopak sensitivita mammografie u žen s pozitivitou BRCA mutace se pohybuje jen kolem extrémních 20-30%. I při nižší specificitě je tedy MR jednoznačně metodou volby – je lépe 90% lézí detekovat, i za cenu nižší specificity (detekované léze možné sledovat, bioptovat), než detekovat jen 20-30% lézí (MG). Zde pak vyplývá důležitá skutečnost nutnosti MR bioptické navigační jednotky – k možnosti histologické verifikace lézí, které lze detekovat jen v MR obrazu a které jsou MG a UZ nedetekovatelné a tedy také nebioptovatelné.

MR screening žen s vysokým rizikem karcinomu prsu je v MOU plně zaveden a úspěšně probíhá. Celkově je dosud vyšetřeno 190 žen, v roce 2007 bylo nově vyšetřeno 51 žen a provedeno 130 MR vyšetření.

2) Magnetická rezonance prsu v předoperačním stagingu již diagnostikovaného invazivního karcinomu prsu a DCIS

76 MR prsu v období 10/05 -11/07

25 MR prsu v roce 200

Možnosti MR :

Invazivní karcinom - lépe stanovit velikost nádoru (shoda s finální histologií MR 90%, MG 73%)

- stanovit vyloučit multicentricitu (MR 90%, MG 40%)
- stanovit vyloučit kontralaterální Ca (až 5% okultních kontralater. Ca)

DCIS - lépe stanovit rozsah - tedy DCIS mimo mikrokalcifikace viditelné v MG obraze (tedy mamograficky „němé“)

Cíle stagingu pomocí MR:

- snížení rizika pozitivních resekcčních okrajů
- snížení počtu reoperací pro pozitivní okraje
- snížení stresu pacientky , řešení všech karcinomů v jedné době

Závěr: Průběžné výsledky ukazují pozitivní vliv zařazení magnetické rezonance prsu do předoperačního stagingu (změna operačního výkonu až 26%). Bohužel z této indikace bylo zatím provedeno méně vyšetření - 76 vyšetření celkově, 25 za rok 2007.

Na nižším počtu se může podílet i podíl případných falešně pozitivních výsledků - limitace jsou v nižší specificitě metody - falešně pozitivně postkontrastní

enhancement mohou vykazovat F-C změny, inflamace, papilární léze, produktivní granulózní fibroza. Pro možnost ověření a eliminaci těchto falešně pozitivních výsledků by bylo zapotřebí instalovat MR bioptickou navigační jednotku.

3) Obraz postkontrastního MR enhancement jako výraz neoangiogeneze karcinomu prsu.

Teorie časně angiogeneze již u minimálního karcinomu prsu (a high DCIS) je hlavním principem vysoké sensitivity kontrastní magnetické rezonance prsu. Metoda vykazuje téměř 100% sensitivitu v zobrazení invazivního karcinomu a high grade DCIS. V našich pozorováních je patrné, že invazivní lobulární karcinom má větší variabilitu enhancement (absolutní hodnota i tvar křivky) než invazivní duktální karcinom, častěji se vyskytuje i „benigní“ typ enhancement (křivky typu I. a II. – kontinuální nárůst a plateau). U DCIS neexistuje specifický typ (vzor) enhancement – může být jakýkoli typ – ložiskové, segmentální, duktální – proti okolí a druhé straně asymetrické. Falešnou pozitivitu mohou působit změny s produktivní fibrozní (fibrovaskulární) reakcí (období fibrovaskulární desmoplastické reakce u IC) – granulační pooperační fibroza, komplexní radiální léze.

4) Fyziologické enhancement mléčné žlázy.

Zvláště při vyšetřování mladých žen s vysokým rizikem vzniku ca prsu je patrné, jak rozsáhlé může být kolísání fyziologického enhancement mléčné žlázy v závislosti na fázi menstruačního cyklu. Čím je žena mladší a čím bohatší (denzní) je mléčná žláza, tím je enhancement výraznější. Maximum se objevuje v 1. a 4. týdnu menstruačního cyklu, nejméně ve 2. týdnu cyklu. Základní podmínkou dobře provedené kontrastní magnetické rezonance prsu je proto pokud možno striktní dodržování provedení vyšetření ve 2. týdnu menstruačního cyklu pro eliminaci nežádoucího fyziologického enhancement a tím i možné falešné positivity MR vyšetření. Při podezření, že MR obraz je podmíněn zvýšeným fyziologickým enhancement je indikována kontrolní MR v kratším odstupu za 3-6 měsíců a ve správné fázi cyklu, ne okamžitá biopsie.

Závěr: Magnetická rezonance prsu je metoda s nejvyšší sensitivitou pro detekci (zobrazení) invazivního karcinomu prsu a high grade DCIS. Její optimální využití je v

indikacích, které vyžadují a využijí vysokou sensitivitu a naopak nečekají v první řadě jednoznačnou specifikaci léze.

Na základě vlastních zkušeností s 631 vyšetřeními můžeme konstatovat, že mezi optimální indikace MR prsu patří: MR screening žen s vysokým rizikem karcinomu prsu i předoperační MR staging karcinomu prsu. Plánováno je zařazení MR do algoritmu sledování účinku neoadjuvantní chemoterapie karcinomu prsu.

Méně vhodné jsou indikace, které očekávají vysokou specifitu (mylná představa, že MR nahradí biopsii) - je-li nejasná léze v MG nebo UZ obraze, není metodou volby MR, ale core biopsie.

Ke zvýšení specifity metody a komplexnosti provádění MR diagnostiky prsu však nutně patří možnost provedení MR navigované biopsie prsu.

Publikace a prezentace :

Fait V., Chrenko v., Schneiderová M., Sirotek L.: Změny ve spektru operací prsu po zavedení mammárního screeningu., Klinická onkologie, 1/2007

Schneiderová M., Bartoňková H., Petráková K., Foretová L.: Vyšetřování prsu u žen s vysokým rizikem karcinomu prsu., Sborník symposia Onkologie v gynekologii a mamologii, Brno, leden 2007

Schneiderová M., Belanová R., Opletal P., Bartoňková H.: MR prsu – optimální indikace. 7. konference Omyly v mammární diagnostice, Horní Cerekev, 6/2007

Schneiderová M., Belanová R., Opletal P., Bartoňková H.: Indikace MR prsu. Regionální onkologický seminář, říjen 2007, MOU Brno

CT kolonografie (virtuální kolonoskopie)

Řešitel : MUDr. P.Opletal

Cíle

- 1.Proveditelnost a hodnotitelnost vyšetření tračníku pomocí CT kolonografie (virtuální kolonoskopie), úskalí metody, falešná negativita, pozitivita
- 2.Korelace CT kolonograficky zjištěných nálezů s následnou kolonoskopií či operační revizí event. histologií; senzitivita, specifita

3. Možnost zobrazení orálního tračnicku od místa maximálního průniku kolonoskopu u stenozujících tumorů, korelace s operační revizí

Soubor 1

Od 3/05 do 11/07 vyšetřeno CT kolonografií 34 pacientů (17 - 77 let).

Pouze u jedné pacientky (3%) nebyl nález hodnotitelný z důvodu nedostatečně rozepjatého tračnicku při peritoneální MTS diseminaci s ascitem

U 5 pacientů (14,7%) byl prokázán maligní tumor, který byl potvrzen jinými metodami, přičemž 1x zde byla konvenční kolonoskopie negativní (tumor caeca)

U 4 pacientů solitární či vícečetné polypy do 10 mm, potvrzené kolonoskopicky či peroperačně

Soubor 2

U 2 pacientů (6%) falešně pozitivní nález - vícečetné přisedlé polypy v kolon caecoascendens, exofytický Tu v oblasti Bauhinské chlopně, obojí následnou kolonoskopií v celkové anestezii verifikováno jako fekální zbytky.

2 x nebylo možno rozhodnout o benigním či maligním charakteru stenózy anastomózy. 1 x lymfadenopatie v mezokolon, 1 x MTS jaterní, 1 x incidentální Tu ledviny, 7 x divertikulóza.

14 pacientů s prakticky negativním CT kolonografickým nálezem, tito však většinou dosud nebyli dále verifikováni

Předběžné závěry

Metoda CT kolonoskopie je dobře proveditelná a hodnotitelná, má nižší specificitu v pravém tračnicku, výhodou je zobrazení okolních struktur. Naplnění cílů studie je limitováno nízkým počtem provedených vyšetření (cíl 2 a 3), dále počáteční nezkušeností s hodnocením, CT přístrojem "jen" s dvěma řadami detektorů.

Většina negativních nálezů na CT kolono nebyla verifikována jinou metodou, neboť šlo o pacienty netolerující konvenční kolonoskopii. Řešením budou kontrolní CT kolonografie s časovým odstupem k zpřesnění vyhodnocení senzitivity a specificity primárního vyšetření

Detekce kardiomyopatií

Řešitel : MUDr.J. Umlauf, PhD

Cílem studie je posoudit přínos vyšetření NT-proBNP v časně detekci kardiotoxicity u rizikových (předléčených antracykliny) pacientek s karcinomem prsu léčených herceptinem pro návrat choroby. Dále jsme se snažili o současné zhodnocení korelace s vyšetřením echokardiografickým (ejekčních frakcí).

-Pacienti a metody: 39 nově zařazených pacientek léčených pro karcinom prsu v předchozích letech chemoterapií obsahující antracykliny, nejčastěji kombinací FAC (5-Fluorouracil, doxorubicin, cyklofosfamid) a v současné době léčené pro progresi choroby herceptinem (trastuzumab) bylo před zahájením této terapie a v jejím průběhu (v měsíčních intervalech) vyšetřeno na hodnoty NT-proBNP v krvi. U nemocných bylo provedeno EKG a echokardiografické vyšetření a hodnoceny ejekční frakce před zahájením terapie a v měsíčních intervalech.

Výsledky jsou ve vyhodnocování a doplní výsledky souboru z roku 2006 (27 pacientek). Takto zvětšený soubor bude statisticky zpracován v 1. čtvrtletí roku 2008 kdy lze také očekávat publikační výstupy.

II. Program informační podpory

Fúze a elektronické zpracování obrazů

Řešitelé : Ing. Bartl, MUDr. K.Bolčák, MUDr. .Staníček,

Fúze obrazů NM s CT-MR-PET

Vyřešené úkoly:

Optimalizace archivačního skriptu pro zvýšení rychlosti prováděných oprav metodou „on-fly” během odesílání obrazových dat ve formátu DICOM 3.0 z vyhodnocovací stanice PICKER PRISM 2000XP na PACS archiv.

Neplánovaně bylo nutné zahrnout do projektu takové on-line monitorovací mechanismy, které zajistí automatické generování e-mailové zprávy pro nadefinované správce systému v případě výskytu chyb během odesílání již opravených obrazových dat z dočasného na cílový PACS archiv.

Důvodem byly velmi časté, dlouhodobě však neřešené a zcela bezdůvodné výpadky spoje-ní během archivace dat v období únor – srpen 2007. Off-line monitorování právě archivovaných dat před ztrátou však existuje již od zahájení projektu.

Řešené úkoly:

Odstranění náhodně generované chyby během konverze nativního obrazového formátu do formátu DICOM 3.0, která mění, někdy až o několik řádů, hodnotu šířky a centra prohlížečícího okna. Dočasným řešením je automatické nastavení šířky a centra okna u prohlížeče Radworks nebo ruční změna nastavení jasu a kontrastu u obrazových dat uložených s touto chybou u prohlížeče TomoCon.

Úprava originální „klikací aplikace” ke komunikaci s PACS archivem, v SW prostředí vyhodnocovací stanice Picker, pro zajištění správného postupu archivace.

Publikace a prezentace :

Bartl : Jak na chyby ve formátu DICOM u zdrojových modalit. Elektronický sborník - III. Mezinárodní kongres informačních technologií ve zdravotnictví TELEmedicína BRNO2007, Brno 29-30.3. 2007

a

Elektronický sborník -Seminář sekce pro fyziku, elektroniku a výpočetní techniku ČSNM ČLS JEP, Mladá Boleslav, 19-20.4. 2007

Fúze PT s CT-MR pro RT

Řešené úkoly: Odstranění neopodstatněného vzájemného posunu souřadnic u nově vygenerovaných sérií PET a CT/MR tomografických řezů z fúzovaného obrazu. Chybu způsobuje SW prostředí Siemens Esoft verze 4.x, určené pouze pro modalitu PET, (náhrada odzkoušeného řešení se SW Esoft@Leonardo verze 5.x pro stávající hybridní modalitu PET/CT). Novější verze 5.x až 6.1, doporučené i pro samotnou PET kameru, však neumožňovaly řádnou činnost některých standardních funkcí pro vyhodnocení samotného PET vyšetření (nefunkční výpočet SUV ve 3D zobrazení v modulu Esoft a zobrazování jednotlivých sérií jako dalších studií daného vyšetření po importu obrazových dat z akviziční konzoly Ecat Siemens). Poslední verze 6.3 proto nebyla z důvodu obav lékařů z nečekaných problémů zatím instalována. Jako nejschůdnější řešení se jeví použít poslední verzi SW *Esoft@Leonardo*, dodaného s vyhodnocovacími stanicemi k nové hybridní modalitě Siemens TruePoint PET•CT, který obsahuje i licenci k exportu ROI do požadovaného formátu „DICOM RT”.

Měření kvality PET systému

Vyřešené úkoly: Bezchybný přenos jedinečného identifikátoru studie v podobě „Accession Number”, generovaného z čísla elektronické žádanky v NIS, z nativního obrazového formátu ecat7 do formátu DICOM 3.0 k provázání NIS a PACS v MOÚ.

NIS je s PACS vzájemně propojen prostřednictvím jedinečného identifikátoru (na straně PACS pomocí vyhledávacího klíče „Accession Number”) k vyhledání všech obrazových dat pro dané vyšetření na dané obrazové modalitě. Obrazové modalitě

bez možnosti zapsat tento jedinečný identifi-kátor do odpovídající datové položky (obvykle v případě nativního obrazového formátu (ecat7 pro PET Ecat Accel)) mohou obvykle použít pouze datovou položku pro jedinečný identifikátor studie Study ID. V případě, kdy je ale nutné provést přídatnou studii k danému vyšetření, však dojde k nežádoucímu přepsání předchozí obrazové studie. Jediným možným řešením tohoto problému je umělá modifikace Study ID pro přídatné studie na akviziční konzole Ecat Siemens. Pro správnou archivaci a výběr všech studií na PACS, patřících k danému vyšetření, je nutné po konverzi nativního obrazového formátu do DICOM 3.0 zpětně zapsat do prázdné datové položky „Accession Number” původní nemodifikovanou hodnotu. Na základě výše uvedeného byl pro generování umělého Study ID upraven již dříve navržený DICOM Modality Worklist pro PET systém SIEMENS Ecat Accel v podobě intranetové aplikace. Po konverzi nativního obrazového formátu ecat7 do DICOM 3.0 na vyhodnocovací pracovní stanici Esoft Siemens, jsou na PACS odesílaná obrazová data přijímána dočasným PACS běžícím na intranetovém severu ONM. Zde je zpětně rekonstruována původní hodnota „Accession Number” z datové položky s umělým Study ID a současně zapsána do odpovídající prázdné datové položky formátu DICOM 3.0. Tímto způsobem opravená data jsou přeposlána na cílový PACS a po úspěšné archivaci smazána z dočasného PACS.

Uvedená metoda řeší také problémy s dlouhým názvem pro Study ID (Ecat patientská databáze ukazuje plnou délku NM2007123456, ale datová položka v nativním obrazovém formátu ecat7 je kratší (pouze 11 znaků) a jedinečné Study ID je zapsáno zkráceně, NM200712345, bez jakéhokoliv upozornění) a s nesprávnými DICOM tagy (Referring Physicians Name je zapsán po konverzi nativního obrazového formátu ecat7 do DICOM 3.0 do tagu Performing Physicians Name).

Vzhledem k tomu, že výše popsaná metoda musí ke své činnosti využívat dočasný PACS archiv a během archivace jediného vyšetření odesílá stovky obrazových dat, potýkala se během svého vývoje a testování nejčastěji s již dříve popsanými neřešenými výpadky spojení. Stala se tak zároveň projektem, který tuto problematiku dokázal monitorovat a zároveň 100% ochránit odesílaná obrazová data před nežádoucí ztrátou. Předčila i zapůjčenou technologii firmy ICZ, která archivovala obrazová data v období téměř beznadějného hledání nejasných příčin výpadků na datové síti a u níž došlo v několika případech k totální ztrátě archivovaných dat.

Aplikované on-line monitorovací mechanizmy byly po úpravě převzaty i předchozím projektem.

Řešené úkoly:

Převody postupů pro zpracování dalších výsledků měření kvality PET systému k rychlejšímu vyhodnocení a zobrazení v intranetové aplikaci.

Publikace:

Bartl J : Study ID On PET Siemens Ecat Accel In HIS & PACS Network

Sborník EANM 2007 – Kodaň, Dánsko 13-17.10. 2007

a

Sborník XLIV. Dni nukleární medicíny s mezinárodní účastí – Nitra, Slovensko 13-15.9. 2007

SUV (Standard Uptake Values) u PET - intranetová aplikace

Výsledky:

Přestože je ukazatel SUV bezrozměrná hodnota, závisí však na čase, v kterém byla změřena aktivita aplikované FDG. Z tohoto důvodu byla firma Tema požádána o zprovoznění synchronizace systémového času se serverem časového normálu u PC pro rozplňovací poloautomat FDG. Dodávka upravené verze OS k uvedenému PC však proběhla až koncem listopadu 2007. Po synchronizaci systémového času u akviziční konzoly Ecat Siemens tak budou zajištěny všechny předpoklady pro správný výpočet SUV na vyhodnocovací stanici Esoft Siemens.

Po zkušenosti zahraničního pracoviště NM s nepředpokládaně chybným vyhodnocením SUV na fantomové studii u kamery PET/CT Philips Geminy, a to při použití standardního rekonstrukčního algoritmu, bude k ověření výpočtu SUV provedeno kontrolní měření i u naší kamery PET Ecat Accel.

Vzhledem k velmi malému počtu vyšetření (7 pacientek) se sledovanou diagnózou karcinomu děložního čípku a s přihlédnutím k výše uvedeným skutečnostem, nebylo provedeno statistické vyhodnocení Dual-Time vyšetření.

Pro další období se uvažuje rozšířit soubor vyšetření o další, zatím neurčenou, diagnózu.

Řešené úkoly:

On/Off-line import hodnot SUV z NIS/MIS k vyhodnocení Dual-Time vyšetření v intranetové aplikaci (pro jednoduchý export hodnot SUV je vhodná parametrická dokumentace výsledků vyšetření v NIS).

PACS – komunikační prostředí pro výměnu obrazové dokumentace mezi zdravotnickými zařízeními

Řešitel : MUDr. P.Andres

V rámci rozvoje PACS na MOÚ byl projekt v rámci FUNDIN navázán na další projekty s tematikou telemedicíny na projekty:

- a) LF MU (Andres, Krupa, Válek, Dušek, Dostál) – vytváření výukových anonymizovaných atlasů PACS
- b) AV ČR (Andres, Dostál, Šárek, Vyzula) – komunikace mezi zdravotnickými zařízeními nad obrazovou dokumentací
- c) R-Bay, Evropské komise, eTEN (Andres, Kovář, Bartoňková, Vyzula) + UK, Finsko, Dánsko, Estonsko, Holandsko, Norsko, Litva – přeshraniční komunikace nad obrazovou dokumentací, druhá čtení v PACS v rámci EU

V rámci projektu došlo k další specifikaci jednotlivých modalit, které byly připojeny na archiv PACS na ÚVT, došlo k další rutinní komunikaci s mimobrněnskými zdravotnickými zařízeními.

O celém řešení bylo referováno na 2 tuzemských odborných sjezdech.

Andres, P.: Metropolitní PACS JM kraje. Mezinárodní konference Informační systémy a telekomunikační služby ve zdravotnictví, Brno, 2/2007 Abstr. IV.

Andres P. : Metropolitní PACS JM kraje v Masarykově onkologickém ústavu Brno Infokurz projektu programu JPD 3 – Síť podpory vzdělávání ve zdravotnické telematice a e-zdraví, Praha, 2/2007, Téma: eZdraví pro zdravotnické informatiky

III. Program aplikovaných studií

Mammární karcinomy

Mammární kooperativní skupina MAKOS

Koordinátor : MUDr.K. Petráková

Dopad mammárního screeningu na TNM klasifikaci karcinomu prsu a sentinelová uzlina

Řešitelé : doc.MUDr.V.Fait,CSc., MUDr.V.Chreno, CSc., MUDr.O.Coufal,PhD

Východiska: Cílem srovnání je objektivizovat krátkodobý přínos mammárního screeningu na reálných datech operativity pro karcinom prsu v MOÚ. Typ studie a soubor: Retrospektivní srovnání základních dat pacientek operovaných v letech 2001 a 2004 na chirurgickém oddělení MOÚ pro karcinom prsu, srovnáno 657 pacientek, 316 v roce 2001 a 341 v roce 2004.

Metody a výsledky: Srovnání souborů pacientek, primárně operovaných na chirurgickém oddělení MOÚ v letech 2001 a 2004 ukazuje hlavní rozdíl ve výrazném nárůstu pacientek s pT1 nálezy z 48,7% na 63% na úkor pT2 z 43% na 30,2% a v souladu s tím i nárůst podílu pacientek v I.klinickém stádiu z 33,5% na 45,7%. Závěry: Výsledky ukazují, že ve sledovaných letech došlo k poměrně zajímavému pozitivnímu vývoji ve skladbě operovaných pacientek. Jakkoliv záměrně nebyl hodnocen způsob, jakým byl nádor zjištěn, je více než pravděpodobné, že základním důvodem změny bylo zavedení mammárního screeningu.

Publikace:

Fait V., Chrenko V., Schneiderová M., Sirotek L.: Změny ve spektru operací prsu po zavedení mammárního screeningu. Klinická onkologie, 20, 2007, 1, 38 – 41.

Fait V., Chrenko V.: Sentinel node biopsy in breast cancer: short time results show appropriate regional control. Neoplasma 2007; 3: 54: 256-261.

Pravděpodobnost postižení dalších axilárních uzlin po pozitivní sentinelové biopsii u karcinomu prsu

Řešitelé : MUDr. O.Coufal, Ph.D., MUDr. P.Fabian , MUDr. R.Nenutil,PhD, MUDr. V.Foltinová, MUDr. P. Vrtělová, doc. MUDr. V. Fait, CSc.

V souvislosti se zavedením biopsie sentinelové axilární uzliny do běžné klinické praxe se naskytá otázka, kdy a nakolik je po odstranění sentinelové uzliny s mikrometastázou nezbytná a prospěšná následná exenterace axily, dosud rutinně prováděná. Projekt probíhá v souladu s postupem nově navrženého protokolu této v ČR unikátní klinické studie. V říjnu 2007 byl projekt schválen Etickou komisí MOÚ . Ve stávající databázi sentinelových biopsií ze zdrojových dokumentů jsou vyhledány pacientky splňující vstupní kritéria pro tuto retrospektivní studii. Tyto pacientky jsou zavedeny do zvláštní databáze a retrospektivně rovněž jsou ze zdrojových dokumentů doplněny četné výše specifikované parametry, které v dosavadní databázi zaznamenány nejsou. Kontrolu databáze doplněné chirurgem provedl patolog do 30.10.2007.

Z biologického materiálu archivovaného na oddělení patologie MOÚ jsou patologem určeny některé parametry, které nejsou uvedeny v rutinních zprávách o výsledku histopatologického vyšetření, zejména údaje o přítomnosti lymfovaskulární invaze a o parametrech spojených s gradingem nádorů. Tyto parametry doplní jsou doplněny do databáze.

Realizace zbývajících bodů je plánována na rok 2008: Integrita celé databáze bude vnitřně překontrolována (kontrola extrémních hodnot a logické shody souvisejících parametrů) – do 31.12.2007. Údaje v databázi budou statisticky vyhodnoceny do 31.3.2008. Výsledky budou publikovány v odborném tisku , článek bude podán do 30.6.2008.

Z publikovaných prací souvisejících s tématem projektu uvádíme:

Coufal O., Fait V., Foltinová V., Vrtělová P., Gabrielová L., Chrenko V. Chirurgická léčba karcinomu prsu v MOÚ. *Rozhledy v chirurgii* 2007, roč. 86, č. 10, str. 540 – 547.

Fait V., Chrenko V., Foltinová V., Coufal O. Výsledky sentinelových biopsií u karcinomu prsu v souboru 1160 pacientů. 11. mamologické sympozium, Praha 21. – 23. listopadu 2007. Abstrakt v: *Vybrané otázky onkologie XI.*, Galén Praha 2007, str. 169 – 170. ISBN 978-80-7262-527-7.

Coufal O. Biopsie sentinelové uzliny u multifokálních a multicentrických karcinomů prsu. *Klinická onkologie* 2007, roč. 20, č. 4, str. 283 – 286.

Fait V. Falešná negativita sentinelových biopsií. 11. mamologické sympozium, Praha 21. – 23. listopadu 2007. Abstrakt v: *Vybrané otázky onkologie XI.*, Galén Praha 2007, str. 174 – 175. ISBN 978-80-7262-527-7.

Prediktivní faktory odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii

Cílem projektu bylo nalézt prediktivní faktory ovlivňující dobu do progresu a celkové přežívání u pacientek s karcinomem prsu léčených neoadjuvantní chemoterapií. Na retrospektivním souboru pacientek byl vyhodnocen vliv steroidních receptorů a overexprese nebo amplifikace HER2 na odpověď na neoadjuvantní chemoterapii, hlavně v parametru dosažení kompletní patologické remise (pCR) a zda existuje vztah mezi steroidními receptory, HER2 a pCR a celkovým přežitím. V roce 1998 až 2003 bylo léčeno celkem 135 pacientek neoadjuvantní chemoterapií.

	V š e c h n y p a c i e n t k y	
1 9 9 8 - 2 0 0 3	P o č e t	%
n	1 3 5	1 0 0
V ě k	m e d i á n 5 2	3 0 - 7 3
K l i n . s t. IIA	2	1 , 5
IIB	2 5	1 8 , 5
IIIA	4 4	3 2 , 6
IIIB	6 4	4 7 , 4
P r e m e n o p .	3 4	2 5 , 2
P o s t m e n o p .	1 0 1	7 4 , 8
S R +	8 0	5 9 , 2
S R -	5 5	4 0 , 8
H E R 2 3 + / F I S H	3 5	2 5 , 9
H E R 2 -	1 0 0	7 4 , 1

Celkem 97% (131) pacientek bylo léčeno chemoterapií na bazi antracyklínů, 14,8% (20) pacientek bylo léčeno kombinací antracyklín + taxan a 3% (4) pacientek chemoterapií bez antracyklínů a taxanů. Kompletní patologická remise byla definována jako nepřítomnost invazivního karcinomu v resekátu a uzlinách. 11,9% (16) pacientek dosáhlo po neoadjuvantní chemoterapii pCR.

	V š e c h n y p a c i e n t k y		p C R	
1 9 9 8 - 2 0 0 3	P o č e t	%	P o č e t	%
n	1 3 5	1 0 0	1 6	1 0 0
V ě k	M e d i á n 5 2	3 0 - 7 3	M e d i á n 5 2	4 3 - 7 3
K l i n . s t. IIA	2	1 , 5	3	1 8 , 8
IIB	2 5	1 8 , 5	0	0
IIIA	4 4	3 2 , 6	5	3 1 , 2
IIIB	6 4	4 7 , 4	8	5 0 , 0
P r e m e n o p .	3 4	2 5 , 2	3	1 8 , 8
P o s t m e n o p .	1 0 1	7 4 , 8	1 3	8 1 , 2
S R +	8 0	5 9 , 2	3	1 8 , 8
S R -	5 5	4 0 , 8	1 3	8 1 , 2
H E R 2 F I S H +	3 5	2 5 , 9	4	2 5
H E R 2 -	1 0 0	7 4 , 1	1 2	7 5

Na souboru byl prokázán vliv steroidních receptorů na dosažení pCR. 24,07 % pacientek s negativními steroidními receptory a 3,75% pacientek s pozitivními steroidními receptory dosáhlo pCR ($p < 0,0005$). Pacientky s pozitivními steroidními receptory a současně overexpresí HER2 dosáhly pCR v 6,67%, pacientky s pozitivními steroidními receptory bez overexprese HER2 v 3,08%, pacientky s negativními steroidními receptory a overexpresí HER2 v 14,29% a pacientky negativitou steroidních receptorů bez overexprese HER2 v 30,30%. Byla prokázána statisticky významná závislost dosažení pCR na stavu steroidních receptorů a současně stavu HER2 ($p < 0,015$). Skupina pacientek s negativními steroidními receptory dosáhla delší doby do progresu a delšího přežití (OS $p < 0,02$, TTP $< 0,08$). Podobná statistická závislost nebyla nalezena u skupiny pacientek s pozitivními steroidními receptory. Stav steroidních receptorů navíc predikuje dosažení pCR. Největší efekt neoadjuvantní chemoterapie byl prokázán u pacientek s negativními steroidními receptory současně bez overexprese HER2. Nejhorší léčebné výsledky dosáhly pacientky s pozitivními steroidními receptory bez overexprese HER2. U této skupiny pacientek by patrně byla lepší volbou neoadjuvantní hormonoterapie. Vzhledem k malému počtu dosažených kompletních remisí nebylo možné hodnotit v těchto skupinách dobu do progresu ani celkové přežívání.

Prediktivní faktory rezistence na tamoxifen u pacientek při tamoxifenu progredujících

V souvislosti se zaváděním inhibitorů aromatázy do adjuvantní léčby karcinomu prsu je stále častěji diskutována možnost predikce selhání adjuvantní léčby Tamoxifenem (TX) z parametrů primárního nádoru. V prezentované studii jsme se pokusili validovat některé z parametrů, uváděných v této souvislosti, na vlastním materiálu.

Analýzou zdravotnické dokumentace byly vyhledány případy mammárního karcinomu s dostupným minimálně pětiletým sledováním, léčené v MOÚ během let 1993-2001. Podmínkou bylo, aby tyto pacientky měly v průběhu adjuvantní léčby TX biopticky verifikovanou lokální recidivu a/nebo disseminaci nádoru. Ze 40 dostupných bioptických vzorků takových primárních nádorů byly vytvořeny

složené tkáňové bloky (tissue microarrays, TMA) na kterých byla provedena semikvantitativní imunohistologická analýza (IHC) běžných prediktivních parametrů (estrogenový (ER) a progesteronový (PR) receptor), doplněná o stanovení Her-2/neu imunohistologicky a FISH, imunohistologii bcl-2, a imunohistologické a FISH stanovení cyklinu D1. Jako kontrolní soubor sloužily konsekutivní soubory ER pozitivních mammárních karcinomů z let 1994-1995 zpracované obdobným způsobem. Byly hodnoceny pouze nádory s IHC pozitivitou steroidních receptorů. Velikost nádoru, postižení axilárních uzlin, grade ani exprese Bcl2 se neprokázaly jako prediktivní faktory rezistence k tamoxifenu.

Dobrymi prediktory se zdají být zvýšená exprese (2+ nebo 3+), případně FISH amplifikace Her-2/neu ($p=0,04$), exprese PR pod 50% ($p=0,02$) a amplifikace cyklinu D1 ($p<0,001$). Pokud definujeme pacientky s některým z těchto faktorů (tj. amplifikace cyklinu D1 a/nebo amplifikace Her-2/neu, a/nebo exprese PR pod 50%) jako „rizikové“ z hlediska selhání adjuvance TX, v testovaném souboru jich bylo 80%, zatímco v ER pozitivních kontrolách 36% ($p=0,03$). Tento přístup se jeví jako použitelný k indikaci inhibitorů aromatázy do první linie adjuvantní hormonoterapie karcinomu prsu.

Petráková K., Vyskočil J, Palácová M., Fabián P., Knoflíčková D., Hanzelková Z
Nenutil R.: Progrese anebo disseminace mammárního karcinomu během adjuvantní léčby Tamoxifenem. Existuje možnost predikce z parametrů primárního nádoru?
Sborník přednášek z 12. ročníku symposia: Onkologie v gynekologii a mammologii.

Petráková K., Vyskočil J., Palácová M., Fabián P., Knoflíčková D., Hanzelková Z.,
Nenutil R.: Amplifikace HER-2/neu a/nebo cyklinu D1, případně negativita progesteronového receptoru, definují pacientky s vysokým rizikem relapsu mammárního karcinomu při adjuvantní léčbě Tamoxifenem. In Edukační sborník: XXXI. Brněnské onkologické dny s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty, Brno 23. – 25. 4. 2007. Brno: Masarykův onkologický ústav, s. 213

Kostní markery a monitorování léčby kostních metastáz

Cíl práce : V rámci řešení VVZ v roce 2006 jsme vyšetřili kostní markery (prokolagen typu 1 N terminální propeptid (P1NP), b-CrossLaps (b-CTX) a ICTP u 60 nemocných s diagnózou karcinom prsu a hodnotili validitu metod vzhledem k přítomnosti kostních metastáz a efektu terapie. ICTP je koncová, nehelikální část kolagenu typu I. Jedná se o části peptidových řetězců, spojených pomocí vazeb (cross-links). Používá se pro posouzení stupně resorpce kosti. Existují 2 různé cesty kostní resorpce: zprostředkovaná katepsinem K, která se uplatňuje během fyziologické resorpce kosti a druhá, zprostředkovaná matrix metaloproteinázou 9 (MMP9), která se aktivuje převážně v patologických situacích. ICTP specificky reflektuje patologickou degradaci kostního kolagenu zprostředkovanou MMP9.

Pacientky a metody : U 60 žen s diagnózou karcinom prsu vzhledem k podezření na kostní rozsev byly vyšetřovány kostní markery b-CrossLaps (CTX) a P1NP, specifický indikátor depositu kolagenu 1, definovaný jako marker novotvorby kostí, metodou elektrochemiluminiscence na imunoanalyzátoru Elecsys 2010, ROCHE a ICTP manuální EIA metodou (Orion – Diag).

Byly hodnoceny parametry validity (senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, relativní riziko a ROC křivka). Bodové odhady parametrů validity byly doprovázeny výpočtem 95% konfidenčních intervalů. Ke statistickému hodnocení byl užit Spearmanův korelační koeficient.

Výsledky

U 44 nemocných byly skutečně prokázány kostní metastázy pomocí RTG či CT, u 16 nemocných byl nález na kostech hodnocen jako negativní. Při referenční hodnotě 5,3ug/l pro ICTP je specifická 87,5%, senzitivita 81,8% a plocha pod ROC křivkou (AUC) činí 0,87. ICTP u nemocných s kostním rozsevem hodnoceno proti souboru nemocných bez metastáz metodou ANOVA vykazalo : p-value = 0.0011, Wilcoxonův test p-value 0.0001 a mediánový test s p-value <0.0005.

Závěr

Kostní markery, zejména ICTP, β -Cross Laps (b-CTX), markery kostní resorpce a P1NP jako marker novotvorby kostí, jsou doporučovány k diagnóze kostních metastáz i hodnocení efektu jejich terapie podle doporučení EGTM.

Pro ICTP u kostních metastáz karcinomu prsu byla prokázána specifická 87,5% a senzitivita 81,8%, tedy nejvalidnější parametry ze srovnávaných metod. ICTP je tedy vysoce specifický marker kostní degradace v kostních metastázách a představuje citlivou a snadnou metodu detekce kostních metastáz i monitorování jejich terapie. První výsledky monitorování efektu terapie budou prezentovány.

Publikace a prezentace :

Šimíčková M., Nekulová M., Petráková K., Pecen L.*, Staníček J., Frgala T., Pilný R., Dubská L., Valík D.: Sérový N-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP) a kostní metastázy karcinomu prsu. Klinická onkologie 2/2007, ročník 20, 220-223.

Nekulová M., Petráková K., Šimíčková M., Pecen L., Pilný R., Dubská L., Valík D.:Kostní markery v diagnóze a monitorování léčby kostních metastáz u Ca prsu. C -Telopeptid kolagenu typu I (ICTP) v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prsu. BOD Brno, 25.4.2007 – Abstrakt ve sborníku.

Nekulová M., Mechl Z., Šimíčková M., Pecen L., Dubská L., Valík D.: Současné možnosti stanovení kostních markerů. Onkologická sympozia Praha 21. – 23.11.2007.

Nekulová M., Petráková K., Doležel J., Dubská L., Valík D.: Vyšetřování kostních markerů u onkologických pacientů. Seminář lékařů Společnosti JEP ve Vyškově 1.11.2007.

Karcinomy trávicího traktu

Digestivní kooperativní skupina DIKOS

Koordinátor : Doc. MUDr.R.Šefr,PhD

Korelace PET/CT s peroperačním a histologickým nálezem pro dg. C 18-20, C 25

Probíhá náběr dalších pacientů a zpracování výsledků ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz MU Brno.

Publikace:

Ondrák M, Šefr R. Role PET a CT vyšetření v managementu léčby zhoubného nemocnění tlustého střeva a konečníku. Rozhl. Chir. 86, 9, 2007, s. 461-465

Cirkulující nádorové buňky v periferní krvi a sentinelových mízních uzlinách

Kompletace naměřených výsledků.

Publikace :

Fait V, Chrenko V, Šefr R, Feranec R, Žaloudík J. Sentinelová biopsie a její role v jednotlivých oblastech onkochirurgie – současný stav. XXXI. Brněnské onkologické dny, 23. 4. – 25. 4. 2007, Edukační sborník XXXI.BOD 2007

Chromogranin A u karcinoidu

Řešitel : MUDr.M.Šachlová,CSc.

Program je zaveden do rutinní praxe, hrazen zdravotní pojišťovnou. Je plánováno vyhodnocení souboru a publikace.

Gynekologické nádory

Gynekologická kooperativní skupina GYKOS

Koordinátor : MUDr.M.Bláha

Diagnostika rekurence karcinomu ovaria pomocí PET a sérových markerů

Sledování korelace nálezů PET a nádorových markerů v diagnostice recidivy onemocnění žen léčených pro ovariální karcinom.

Výsledky: metodika a zahájení sběru dat v r. 2006. V r. 2007 bylo odesláno k vyšetření PET a současně CA 125 68 nemocných s dg C56. Dle průběžných výsledků 15 pacientek nehodnotitelných (duplex, nepotvrzení maligní dg apod.), u 29 byla správná pozitivita markeru, u 20 správná negativita markeru. Falešná negativita markeru byla ve 4 případech, falešná pozitivita nebyla zaznamenána. Z toho vypočtená senzitivita činí 87,9% při 100% specifičnosti. Soubor má 53 hodnotitelných žen. K nim lze přidat soubor z roku 2006 s podobnými výsledky. Vzorky byly současně uloženy k analýze kalikreinů.

Publikace a přednášky:

Nekulová M. Bláha M., Bolčák M., Valík D.: Srovnání přínosu nádorových markerů a zobrazovacích technik v onkologii, monitorování efektu terapie. Kurz ILF Laboratorní vyšetřování v onkologii Praha 21.11.2007

Sentinelové uzliny a jejich značení pomocí hysteroskopie u karcinomu endometria

Zhodnocení možnosti mapování lymfatických uzlin a biopsie sentinelové uzliny u pacientek s karcinomem endometria. Využití předoperační hysteroskopie k vizualizaci tumoru a aplikaci subendometriální injekce radiokoloidu a Patent Blau.

Výsledky: vypracovaná metodika a technické detaily postupu značení sentinelové uzliny a schválení projektu etickou komisí v roce 2006. Dosud zařazeno 11 pacientek splňujících vstupní kritéria projektu. Dle dosavadních předběžných výsledků se metodika jeví jako perspektivní, pouze u 1 pacientky nebyla sentinelova uzlina detekována předoperačně na scintigramu ani následně peroperačně. Nadále probíhá nábor pacientek.

Publikace :

1) Feranec R, Otevřel P, Frgala T, Dörr A. Mapování lymfatik a biopsie sentinelové uzliny u pacientek s karcinomem endometria.

Klinická onkologie 2007; 20 (2): 199–204.

Nové prognostické faktory u cervikálního karcinomu

Hodnocení prognostických faktorů u karcinomu děložního čípku za účelem predikce šíření mimo jeho hranice a rizika rekurence.

Výsledky: Byla vypracována metodologie sledování stanovených parametrů (p21, cdk4, p53, p16, p27) a zvolena kritéria pro výběr pacientek. Dosud bylo zařazeno do souboru 28 pacientek. Dle předběžných dílčích výsledků se jeví jako nejperspektivnější marker predikce postižení lymfatických uzlin lymfovaskulární infiltrace. Nadále probíhá nábor pacientek i follow up již zařazených.

Urologické nádory

Urologická kooperativní skupina UKOS

Koordinátor : MUDr.J.Doležel,PhD

Možnosti FDG-PET v diagnostice a léčbě testikulárních nádorů

Řešitel : MUDr. Z. Řehák

K 30.8.2007 bylo v MOÚ Brno provedeno 655 PET vyšetření u 578 pacientů s diagnózou testikulárního karcinomu v indikacích staging, therapy control, restaging, podezření na relaps choroby. Rozborem heterogenního souboru byly specifikovány 3 zájmové okruhy.

a/ Hodnocení viability residuálních postterapeutických mas v retroperitoneu

Dle literárních údajů jsou retroperitoneální reziduální postterapeutické masy tvořeny ve 48% fibrosou, v 37% teratomem a v 15% viabilním nádorem. Cílem úkolu bylo stanovit roli F-FDG-PET ve zpřesnění indikace k retroperitoneální lymfadenektomii u pacientů klin. stadia IIA-IIC podstupivších systémovou chemoterapii. Jednalo se o rozšíření souboru 18 nemocných z let 2005-2006 na 25 pacientů (3x seminom, 20x non-seminom). Bylo provedeno předoperační PET a CT s fúzí obrazů, retroperitoneální lymfadenektomie do 90 dní po PET, srovnání histologických nálezů s PET pozitivními a PET negativními výsledky. PET pozitivita byla vyjádřena u viabilního residua seminomu i neseminomu, při zánětlivé celulizaci v retroperitoneální fibróze. PET negativita byla pozorována u mikrometastáz teratoca, zralého teratomu a u fibrózy. PET negativita nemůže být kontraindikací retroperitoneální lymfadenektomie zejména u non-seminomů. Indikaci k zamítnutí lymfadenektomie u seminomů na základě negativity F-FDG-PET je nutno ověřit na větším počtu nemocných, výskyt postterapeutických retroperitoneálních mas u této diagnosy je vzhledem k výborné senzitivitě k systémové léčbě výrazně nižší než u non-seminomů. Předběžné výsledky jsou povzbudivé a doložené i dalšími údaji v písemnictví

b/ Hodnocení PET ve stagingu testikulárních karcinomů

Předpokladem pro vyhodnocení přínosu F-FDG-PET ke stagingu C62 bylo provedení kompletního radiologického předléčebného stagingu (CT břicha a retroperitonea, CT plic a mediastina), V MOÚ bylo do konce srpna 2007 provedeno 163 takovýchto

diagnostických studií (61 seminomů, 102 non-seminomů). Shoda mezi CT a PET vyšetřením byla zjištěna v 87,7 % (143 vyš.), neshoda ve 12,3% (20 vyš.) Detekce více metastatických lokalizací u PET než CT zjištěna ve 10,4% (17 vyš.), negativita PET u evidentně pozitivního CT v 1,9% (3 vyš.). Kombinace CT a PET vyšetření ve stagingu nemocných s nádory varlat může umožnit zachycení metastáz v méně obvyklých lokalizacích nebo v nezvětšených uzlinách, změnu klinického stadia tento fakt podmiňuje jen u několika málo nemocných (seminom klin.st II A,B – III – pozitivní nezv. uzlina, v mediastinu.) Slabým místem hodnocení souboru je fakt, že nálezy jak PET tak CT nebylo možno porovnat s nálezy histologickými (retroperitoneální stagingovou lymfadenektomií podstoupil pouze 1 pacient) a tak jsou více méně hodnoceny 2 zobrazovací metody proti sobě. Role F-FDG-PET ve stagingu C 62 není stále obhájena a je předmětem celé řady studií

c/ F-FDG-PET u podezření na relaps testikulárních karcinomů

Okruhem zájmu byl soubor 23 nemocných s diagnózou testikulárního tumoru v remisi po předcházející léčbě u nichž došlo k elevaci nádorových markerů a konvenční diagnostika nevedla k odhalení místa progresu. F-FDG-PET objasnila místo relapsu u 12 pacientů.

Publikace :

Tomášek, J., Kiss, I., Řehák, Z., Halámková, J., Mechl, M., Andrašina T. Vybrané aspekty dispenzární péče pacientů s tumory varlat po kurativní terapii. In Edukační sborník: XXXI. Brněnské onkologické dny s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty, 23.-25. dubna 2007, s. 116, č. 59.

Řehák, Z., Kocák, I., Fabián, P., Penka I., Pacal, M., Čapák, I., Lakomý, R., Bolčák, K., Nižňanská V., Staníček, J., Stupalová, J., Bartl, J., Tomášek, J. Reziduální retroperitoneální infiltrát u nemocných s germinativním tumorem varlat – lze určit jeho viabilitu pomocí ¹⁸F-FDG PET? In Edukační sborník: XXXI. Brněnské onkologické dny s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty, 23.-25. dubna 2007, s. 338-339, č.219.

Řehák, Z., Kocák, I., Fabian, P., Čapák, I., Bolčák, K., Lakomý, R., Nižňanská, V., Staníček, J., Stupalová, J., Bartl, J. Residual retroperitoneal masses in patients with

germinative testicular tumor: can its viability be determined via ^{18}F -FDG PET? Eur J Nucl Med Mol Imaging, vol 34, Oct. 2007, Suppl. 2, s. 295, P 144.

Řehák, Z., Čapák, I., Doležel, I., Miklánek, D., Kocák, I., Fabián, P., Penka, I., Pacal, M., Lakomý, R., Bolčák, K., Staníček, J. Reziduální retroperitoneální infiltrát u nemocných s germinativním tumorem varlat – lze určit jeho viabilitu pomocí ^{18}F -FDG PET? Zhodnocení na vlastním souboru 25 nemocných. Česká urologie 2007,1:s.55 (abstrakta z výroční konference ČUS 10.-12.10 2007, Plzeň)

Řehák, Z., Kocák, I., Čapák, I., Opletal, P., Staníček, J., Nižňanská, V., Lakomý, R. ^{18}F -FDG PET ve stagingu nádorů varlat – soubor 163 nemocných. In Vybrané otázky onkologie XI. s.44-45, Galén 2007. (abstrakta z 15. uroonkologického sjezdu 21.-22..11.2007 Praha)

Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty

Řešitel : MUDr. M. Nekulová, CSc.

Kostní markery, zejména beta- cross laps (b-CTX) a N- terminální propeptid kolagenu typu I (P1NP) jsou novými doporučeními EGTM navrženy k hodnocení efektu léčby kostních metastáz, dále mohou poskytnout doplňkovou informaci v případě diagnostických rozpaků u suspekce na kostní metastatický proces. Za určitých okolností by mohly přispět časně detekci kostní diseminace. V roce 2007 bylo provedeno vyšetření kostních markerů současně s hladinou PSA u 218 nemocných s dg. ca prostaty. Soubor byl stratifikován do 3 skupin : A/ hodnota PSA pod 0,2 (120 pac. , 55%) ,B/ hodnota PSA 0,2-0,5 (28 pac.,13%), C/ hodnota PSA vyšší 0,5 (70 pac., 32%). Z osteomarkerů byla stanovena hodnota P1NP (N-terminální propeptid kolagenu typu I), marker novotvorby kosti a betaCTX (β-Cross Laps), marker osteoresorpce, ve všech odeslaných vzorcích, u některých nemocných také ICTP (marker osteoresorpce). U pacientů s hodnotou PSA nižší 5 bylo zjištěno 23% patologických hodnot P1NP signalizujících novotvorbu kosti. b-CTX, β-Cross Laps (beta-CTX se pro tuto diagnózu neukázal jako dostatečně citlivý marker (jen 8% - 18/217 zvýšených hodnot). Bude nutno tento marker nahradit ICTP- viz níže. Pro P1NP (ři referenční hodnotě 62,6 ug/l a specifičnosti 90%, 95%CI (75,7%,

100,0%) byl kostní rozsev hodnocen se senzitivitou 77,8%, 95%CI (64,2%, 91,4%), PV+ činila 93,3%, 95%CI(84,6%, 100,0%) a PV- = 68,0%, 95%CI(49,3%, 86,7%). AUC (plocha pod křivkou) = 0,86477. Nový marker ICTP (Telopeptid kolagenu typu I), specificky reflektuje patologickou degradaci kostního kolagenu zprostředkovanou matrix- metaloproteinázou MMP9. ICTP by měl být tedy vysoce specifický marker kostní degradace v kostních metastázách a představovat citlivou a snadnou metodu detekce kostních metastáz i monitorování i terapie.

Při referenční hodnotě 5,3ug/l pro ICTP byla zaznamenána specifita 87,5%, senzitivita 82%, plocha pod ROC křivkou (AUC) 0,87. ICTP u nemocných s kostním rozsevem hodnocené proti souboru nemocných bez metastáz metodou ANOVA vykazalo : p-value = 0.0011, Wilcoxonův test p-value 0.0001 a mediánový test s p-value <0.0005. Soubor je v dalším statistickém hodnocení, je nezbytný další podrobný rozbor ve vztahu ke stadiu onemocnění a absolvované léčbě. Plánuje se zavedení vyšetřování chromograninu A u specificky indikovaných nemocných (negativní prognostický faktor u pacientů s dg C61 léčených hormonoterapií).

Prezentace :

Nekulová M., Petráková K., Doležel J., Čapák I., Miklánek D., Dubská L., Valík D.:
Vyšetřování kostních markerů u onkologických pacientů. Seminář lékařů Společnosti JEP ve Vyškově 1.11.2007

Nekulová M., Doležel J., Čapák I., Miklánek D., Dubská L., Valík D.: Nově požadovaná laboratorní vyšetření u onkologických pacientů. Seminář Onkologické kliniky FN Ostrava- Poruba 13.12.07

Kočičková M., Nekulová M., Šimíčková M., Petráková K., Čapák I., Pecen L., Pilný R., Dubská L., Valík D.: Kostní markery u kostních metastáz, Pracovní konference ČAS, MOÚ Brno, 6.6.2007

Maligní melanom

Melanomová kooperativní skupina MEKOS

Koordinátor : doc.MUDr.V.Fait,CSc.

Sentinelová biopsie u maligního melanomu

Řešitel : doc.MUDr.V.Fait,CSc.

Průběžně probíhá analýza souboru pacientů se sentinelovou biopsií. Je vedena kompletní databáze pacientů, u kterých proběhla sentinelová biopsie u maligního melanomu, se sledováním hlavních prognostických parametrů a průběžným doplňováním dalšího průběhu onemocnění. Data souboru jsou cenným materiálem, jak pro výběr pacientů po další hodnocení, ale také jako kontrola kvality práce.

Soubor v současné době čítá *1271 pacientů*, do hodnocení prozatím nebylo zavzato 68 pacientů za poslední 4 měsíce. Z 1203 operací byla sentinelová uzlina nalezena v 1161 případech - *úspěšnost je tedy 97% a sentinelová uzlina byla pozitivní v 381 případech - 32%*. Regionální uzlinová metastáza při negativní SNB, což lze hodnotit jako selhání metody, se prozatím objevila v 25 případech - *falešná negativita tedy činí 6,2%*.

Oproti předchozímu hodnocení došlo k poklesu falešné negativity zhruba na polovinu. Tento pokles, jakkoliv příznivý, je nutno zatím hodnotit skepticky, část poklesu může být způsobena změnou složení souboru a částečně kratší dobou sledování, nicméně část je jistě způsoben zlepšeným vyhledáváním po rutinním zavedení radionavigace a část nově zlepšené technice patologické diagnostiky, ve které je dle předchozích zjištění skutečno možno hledat příčinu až poloviny předchozích neúspěchů.

Po nové statistické analýze plánována publikace pro impaktovaný časopis

Problematika byla prezentována ve 4 přednáškách na domácích konferencích a výsledky předchozí analýzy souboru se staly součástí *habilitační práce*:

V.Fait: Biopsie sentinelové uzliny v chirurgické terapii kožního maligního melanomu.

Práce byla obhájena před vědeckou radou LF MU 21.6.2007.

Přednášky:

Fait, V., Chrenko, V., Krejčí, E. :Sentinelová biopsie u karcinomu prsu a maligního melanomu – současný stav. Přednáška, IV. Hodonínské laparoskopické sympozium, Hodonín, 30.3.2007

Fait, V., Kocák, I., Chrenko, V., Krejčí, E. Dispenzární model maligního melanomu na základě prognostických faktorů včetně stavu sentinelové uzliny. Přednáška, Brněnské onkologické dny, Brno 23.-25.5.2007, Edukační sborník.

Fait, V., Chrenko, V., Šefr, R., Feranec, R., Žaloudík, J. Sentinelová biopsie a její role v jednotlivých oblastech onkochirurgie – současný stav. Přednáška, Brněnské onkologické dny, Brno, 23.-25-5-2007.

Fait, V. Falešná negativita sentinelových biopsií. Vybrané otázky z onkologie XI. (2007) pp. 174-175

Hledání markerů špatné prognózy u pac. s diseminovaným maligním melanomem a diferencí v expresi sérových proteinů u pacientů s chemosenzitivním a chemoresistentním onemocněním.

Řešitel : MUDr. R. Lakomý

Na základě zkušeností z klinické praxe je zřejmé, že prognóza pacientů s diseminovaným maligním melanomem je velmi vážná, onemocnění je obecně považováno za chemo a radioresistentní a i multimodální přístup zahrnující kombinovanou chemo(imuno)terapii, radioterapii a paliativní chirurgické výkony špatnou prognózu pacientů většinou významně neovlivní. Přesto se mezi nemocnými s diseminovaným maligním melanomem objeví jedinci s relativně lepší prognózou, bez tendence k časně multiorgánové diseminaci, onemocnění relativně chemosenzitivní, u kterých systémová chemoterapie či imunoterapie může prodloužit období bez příznaků nemoci i celkové přežití. Na druhé straně jsou naopak jedinci s evidentně chemoresistentním onemocněním, progredující i přes

intenzivní kombinovanou systémovou léčbu a umírající na rychlou progresi během několika měsíců.

Podle klinických průběhů onemocnění je evidentní, že podstata rozdílné odpovědi k systémové léčbě (chemoterapie, imunoterapie) nesouvisí s léčbou samotnou, ale naopak je podmíněna rozdílným biologickým chováním vlastního nádorového onemocnění a složitými vztahy mezi hostitelem a nádorem.

Cílem práce je jednak sledování známých prognostických faktorů, dále pokus o nalezení nových (flowcytometrie, vyš. exprese sérových proteinů -SELDI).

A) Pacienti s diseminovaným maligním melanomem (chemoterapií dosud nepředléčení), kteří podstupují paliativní chemoterapii I.linie

U těchto pacientů jsou hodnoceny:

- a) klinicko-patologické faktory (věk, pohlaví, lokalizace prima, přítomnost ulcerace, Breslow, Clark, pozitivita SNB)
- b) laboratorní markery – CRP, LDH, protein S100b, flowcytometrie (CD4/CD8lymf., NK bb), SELDI– odběr před zahájením léčby a při přešetření po CHT
- c) dle možností PET vyš. - před zahájením léčby a při přešetření

Úkol:

1. Statisticky zhodnotit vliv klinicko–patologických faktorů na DFS (čas bez známek onem.) a OS (přežití)
2. Rozdělit soubor pac. na podskupinu *relativně chemosenzitivní (CR+PR+SD) a ** skupinu chemoresistentní (PD)
3. U těchto skupin nalézt difference v laboratorních markerech (SELDI viz. níže) a zjistit jejich vliv na TTP (čas do progresu) a OS
4. U SELDI
 - a) vytipovat odlišné proteiny mezi 2 skupinami a srovnání se SELDI zdravých kontrol
 - b) zjistit korelaci mezi stupněm exprese vytipovaných proteinů s odpovědí na I.linii CHT - predikce léčebné odpovědi
 - c) zjistit korelaci mezi stupněm exprese vytipovaných proteinů a vztah k TTP a OS - prognóza pac.

B) Pacienti s nově diagnostikovaným maligním melanomem s pozit. SNB a pT4 – skupina s vysokým rizikem relapsu

U těchto pacientů jsou hodnoceny:

- a) klinicko-patologické faktory (věk, pohlaví, lokalizace prima, přítomnost ulcerace, Breslow, Clark, léčba adjut. IMT – INF alfa)
- b) laboratorní markery – protein S100b, flowcytometrie (CD4/CD8lymf., NK bb), SELDI– odběr před nebo krátce po disekci spádové lymfatické oblasti a v době zjištěného relapsu
- c) dle možností PET vyšetření v době relapsu

Úkol:

1. Statisticky zhodnotit vliv klinicko–patologických faktorů na DFS a OS
2. Rozdělit skupinu pac. na podskupinu s časným relapsem (do 3 let od dg.) a podskupinu bez relapsu
3. U těchto podskupin hledat difference v laboratorních markerech (protein S100b, flowcytometrie a SELDI) v čase operace (dg) a čase relapsu a zjistit jejich vztah k DFS a OS
4. Porovnání PET vyš. a proteinu S100B v době dg. relapsu (senzitivita a specificita odhalení relapsu)
5. Pac. s relapsem pak zařadit do skupiny A a vyš. viz. doporučení výše

Aktuální stav práce

Běží 1. fáze – pacienti stadia IV., léčení paliativní chemoterapií

Nyní soubor 27 pacientů

12 pac. s relativní odpovědí na CHT (CR, PR, SD)

15 pac. chemoresistentní (PD)

U pacientů provedeny odběry na sérové markery.

Na podzim 2007 u 14 pacientů proběhlo pilotní vyšetření séra na SELDI, nyní zpracováváno statistikem.

Plán na rok 2008 : Rozšiřování souboru pac. s kl. st. IV + publikace s výsledky SELDI u pilotního souboru Souběžná tvorba souboru vysoce rizikových lokalizovaných (pT4, ulcerace) a regionálních forem onemocnění (satelity, intransitní MTS, N+) a vyš. SELDI s důrazem na proteiny vytipované u stadia IV a jejich průkaz u časně relabujících onemocnění.

Sarkomy měkkých tkání

Sarkomová kooperativní skupina SAKOS

Koordinátor : Prof. MUDr.J.Žaloudík, CSc.

Řešitelé : MUDr.M.Ondrák, MUDr.R.Nenutil,PhD, MUDr.H.Bartoňková, MUDr.

J.Růžičková, MUDr. I. Kocák, PhD, Mgr. E.Michalová,Mgr. J.Holčáková

Projekt si klade za cíl shromáždit co nejpočetnější klinický materiál pro inovaci diagnostického systému dosud velmi heterogenní skupiny sarkomů měkkých tkání a pokusit se stanovit zpřesněná indikační kritéria pro cílenější léčbu. Soubor nemocných se sarkomy léčených v MOÚ je nejpočetnější a nejdůkladněji sledovaný v ČR. V rámci projektů Programu technologické podpory VZ FUNDIN jsou všechny sarkomy operované v MOÚ rutinně připravovány k analýzám archivací v bance tkáňového materiálu a sér, jsou rutinně testovány na chemoresistenci MTT testy.

V roce 2007 bylo na chemoresistenci testováno 29 sarkomů.

Jakmile bude dosaženo *potřebného spektra a počtu jednotlivých sarkomových histotypů a gradů* je technologicky připravena kohortní *proteomická analýza* metodou SELDI TOF, která by mohla zachytit dosud neznámé proteomické charakteristiky těchto nádorů jak v tkáňovém materiálu, tak i v séru. Zda se tímto postupem podaří zachytit nový proteinový marker v tkáních či ještě lépe v séru, není zatím jisté, ale bylo by to velmi žádoucí, protože sérový marker pro mesenchymální nádory dosud v praxi zcela chybí. Jeho relevanci lze však potvrdit pouze ve větším souboru, proto je zaveden tento několikaletý sběr těchto relativně vzácnějších typů nádorů. Retrospektivní analýza z parafinových vzorků možná není, je nutná archivace zmrazených tkání a sér v tkáňové bance prospektivním způsobem.

Paralelně jsou ověřovány dva nové terapeutické postupy, tedy *postresekční intersticiální brachyterapie do lůžka nádoru po odstranění sarkomu a předoperační radioterapie sarkomů retroperitonea a dutiny břišní s cílem redukce vaskularizace a krvácení jako příprava na radikální operaci*. Také tyto dva nové postupy vyžadují ověření na větších počtech přípraů a víceleté sledování před doporučením pro rutinní klinickou praxi. Dosavadní průběžné výsledky jsou však velmi slibné a oba postupy jsou zatím prosté komplikací.

Nové projekty připravované obsahově a investičně v roce 2007 k zařazení do FUNDIN od roku 2008

I. Program technologické podpory(PTP)

Nová radiofarmaka

Koordinátor projektu : Ing.J.Adam,PhD

Spoluřešitelé : MUDr. K.Bolčák, Mgr.Grochol

Jde o kvalitativně nové, technologicky velmi náročné projekty pro které se v roce 2007 stalo základnou nové PET centrum MOÚ/ÚJV s cyklotronem a postupně připravovanými syntézními moduly. S ohledem na náročnost tohoto projektu byla již dohodnuta také úzká spolupráce s Mayo Clinic v Rochesteru, USA.

a) 18F misonidazol v predikci radiosenzitivity a radiorezistence zhoubných nádorů
Vazba misonidazolu značeného radionuklidem 18F ve zhoubném nádoru má podle dostupných informačních zdrojů přispět k predikci jeho radiosenzitivity či radiorezistence. Cílem projektu je příprava a testování tohoto v ČR zcela nového radiofarmaka podle platných norem se záměrem nalezení vhodných aplikačních kritérií v klinické praxi, kde podobný marker radiosenzitivity či radiorezistence dosud neexistuje a je vysoce žádoucí.

b) Molekulární zobrazení receptorové vazby trastuzumabu u nemocných s pokročilým karcinomem prsu.

Trastuzumab (Herceptin) je preparátem monoklonální protilátky anti-HER2 schváleným pro léčbu pokročilých stádií karcinomu prsu s prokázanou přítomností receptoru HER2. Protože dostupnost imunohistologického hodnocení nádorové tkáně před léčbou metastáz karcinomu prsu i v jejím průběhu je omezená, může detekce receptoru HER2 metodou molekulární zobrazování technologií PET přispět ke správné volbě indikací této velmi nákladné léčby. Zároveň může přispět k dalšímu poznávání efektu léčby při monitoringu PET nálezu v průběhu léčby. Projekt je zároveň startovním tématem pro možná analogická zobrazování cílových nádorových receptorů dalších protinádorových léčebných přípravků na bázi

monoklonálních protilátek, jimž jsou třeba cetuximab, rituximab, edrecolomab a další. Předmětem výzkumu bude v první fázi stanovení vhodného radionuklidu, neboť s ohledem na čas nutný k vazbě protilátky se zatím vhodnější než fluor zdá být radionuklid jódu.

Konformní 3D brachyterapie u karcinomu čípku s využitím funkční diagnostiky

Koordinátor přípravy : doc.MUDr. P.Šlampa,CSc.

Řešitel: MUDr. J. Růžičková

Spoluřešitelé: doc. MUDr. P.Šlampa, CSc., MUDr. J.Hřivňacká, ing. H. Tichá, RNDr. R.Bartlová, ing. A.Odložilíková, PhD., D.Tomková, J. Fuchsová,

Přechod z 2D k 3D brachyterapii je nezbytným krokem v procesu zajištění konformity léčby. Provedení CT/MR vyšetření v době brachyterapie s již zavedeným aplikátorem umožní individuálně přesněji určit cílový objem pro brachyterapii a aplikovat vyšší dávku přímo do tumoru. Zároveň se přesněji kontroluje dávka v kritických orgánech. V případě 3D plánování při každé frakci lze hovořit o 4D brachyterapii. V MOÚ je kurativně léčeno přibližně 40 pacientek s karcinomem děložního čípku ročně, jejich šance na vyléčení bez výrazných trvalých následků léčby metodou 3D (4D) brachyterapie se významně zvýší.

Přirozené protilátky proti alfa-galaktosylovým strukturám nádorových buněk

Koordinátor přípravy : MUDr.D. Valík, PhD

Řešitel : Mgr.M.Hamanová

Spoluřešitelé : MUDr.D.Valík,PhD, prof. MUDr. J.Lokaj,DrSc

Pro testování nádorových vzorků je připravena imunoenzymatická esej pro kvantitativní průkaz protilátek proti definovanému galaktosylovému epitopu v isotypech IgG, IgM a IgA. Využití těchto přirozených protilátek proti galaktosylovému epitopu by mohlo být potenciálně účinnou metodou imunoterapie nádorů (Galili 2007, Castronovo 1989).

Diagnostika a hodnocení odpovědi na léčbu abdominálních tumorů pomocí funkční magnetické resonance

Řešitel : MUDr. Standara

Spoluřešitelé : MUDr.H.Bartoňková, MUDr.J.Doležel,PhD

Diagnostika a sledování léčebné odpovědi solidních tumorů pomocí čistě morfologických metod dle RECIST/WHO kritérií není odpovídající stavu současných možností protinádorové, zejména biologické, terapie. Zobrazení funkčního stavu nádoru , tedy jeho perfuze, hypoxie, apod. vhodnými MR sekvencemi poskytuje cenné informace.

Řešena budou následující témata :

a) Sledování odpovědi rektálních adenomů na biologickou terapii pomocí perfuzní MR Cílem studie je prozkoumat možnosti kvantifikace odpovědi na podkladě funkčních změn tumoru v MR obraze. S výhodou lze využít ASL sekvencí (FAIR-TrueFISP), vzhledem k nepotřebnosti potenciálně nefropatické kontrastní látky.

b) Funkční zobrazení ložisek GIST jako alternativa k hodnocení dle RECIST/WHO Obdobně jako u renálního tumoru je sledování odpovědi GISTu na biologickou terapii pomocí měření velikosti lézí nedostatečné. Vhodné srovnat výsledky fMRI a PET/CT.

c) MR spektroskopie v diagnostice a sledování tumoru prostaty

Cílem studie je hodnocení účinku terapie a sledování změny v diagnostickém a léčebném postupu po zavedení metody.

d) Sledování léčebné odpovědi tumorů rektu v MR obraze v korelaci k TRUS

Cílem studie je srovnat nálezy MR a TRUS s ohledem na funkční charakteristiku nádoru.

II. Program informační podpory (PIP)

Algoritmus výpočtu dávkové distribuce konformní radioterapie v objemu s nehomogenní strukturou

Řešitel: Ing. J. Garčic

Spoluřešitelé : RNDr. J. Šimíček, ing. M. Steiner, MUDr. P. Čoupek, MUDr. T.

Novotný, MUDr. I. Čoupková, D. Tůmová

Cílem konformní radioterapie je přizpůsobit ozařovaný objem nepravidelnému tvaru nádorového ložiska a jeho velikosti, což vyžaduje využití nových a přesnějších diagnostických postupů kombinujících strukturální a funkční diagnostiku nádoru. Konformním plánováním radioterapie se sníží riziko vzniku především chronických ireverzibilních změn po ozáření a navíc je umožněno zvýšení dávky v cílovém objemu. Nehomogenní prostředí v ozařovaném objemu může vést k ne zcela správnému výpočtu dávky záření. Cílem projektu je zavedení pokročilého výpočetního algoritmu s přihlédnutím k nehomogenitám v těle pacienta a dosáhnout optimalizaci dávky. Výsledkem je dosažení lepší lokální kontroly onemocnění a nižší akutní a pozdní toxicita léčby.

III. Program aplikovaných studií (PAS) :

Prediktivní a prognostický význam amplifikace genu hTERC při vývoji karcinomu děložního čípku

Řešitel : MUDr.L.Mouková

Spoluřešitelé : doc. RNDr. P. Kuglík, CSc., Mgr. D. Žežulková, Bc. N. Kantorková

Podle literárních údajů (Heselmeyer-Haddad et al. 2005) je invazivní karcinom děložního čípku často charakterizován množením či amplifikací genu pro lidskou telomerázu (hTERC). Tato specifická genetická abnormalita byla prokázána i u premaligních cervikálních intraepiteliálních neoplázií CIN2/CIN3 a v současné době je proto považována za důležitý genetický marker, který může predikovat maligní transformaci a progresi onemocnění.

Cílem projektu je detekce amplifikace genu hTERC (3q) pomocí interfázní fluorescenční in situ hybridizace (FISH) prováděné na nátěrech buněk získaných ze stěru z děložního hrdla nebo z děložního čípku. Pro techniku interfázní FISH budou použity DNA sondy hybridizující k oblasti genu hTERC (3q26) a dále k oblasti 3q11, což je kontrolní oblast pro určení počtu kopií chromozomu 3. Získané výsledky genetických analýzy by měly výrazně zpřesnit histologický screening a vytypovat pacientky s vysokým rizikem vývoje karcinomu děložního čípku.

Detekce chromozomových abnormalit u karcinomu děložního čípku pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH)

Řešitel : MUDr.L.Mouková

Spoluřešitelé : doc. RNDr. P. Kuglík, CSc., Mgr. D. Žežulková, Bc. N. Kantorková

Metody genomové profilace založené na technologiích CGH významně přispívají ke zpřesnění genetických analýz u mnoha nádorových onemocnění, neboť umožňují podrobný celogenomový screening nebalancovaných chromozomových změn v rámci jediného vyšetření. Zejména využití platformy oligonukleotidových DNA čipů a techniky array-CGH výrazně zvyšuje efektivitu prováděných genetických vyšetření, přináší nové poznatky o úloze změn počtu kopií jednotlivých genů, které mohou být využity pro účely upřesnění genetické klasifikace nádorového onemocnění a jeho dalšího vývoje.

U karcinomu děložního čípku již byly pomocí techniky CGH opakovaně prokázány oblasti specifických amplifikací, např. (3q) a delecí (2q33-q37) genů souvisejících s vývojem tohoto onemocnění (Rao et al. 2004).

Cílem projektu je pilotní studium zaměřené na celogenomový screening chromozomových abnormalit u karcinomu děložního čípku pomocí technik chromozomové CGH a array-CGH prováděné na oligonukleotidových DNA čipech. Hlavním záměrem je optimalizovat metodiku vyšetření a získat informace o změnách v počtu kopií jednotlivých genů souvisejících s vývojem toho onemocnění.

Pro techniku chromozomové CGH i array-CGH bude použita DNA izolovaná z nádorové tkáně odebírané do tekutého dusíku při vyšetření či operaci. Molekulárně cytogenetické analýzy – vyšetření technikou chromozomové CGH budou prováděny v Laboratoři molekulární cytogenetiky PřF MU. Array–CGH analýzy budou prováděny pomocí DNA mikročipu Agilent Human Genome CGH Microarray Kit 44B a scanneru Agilent v rámci Univerzitního výzkumného centra pro mnočetný myelom